



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**BALBINO LINO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE  
FLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS SOBRE CÉLULAS DE  
GLIOBLASTOMA HUMANO**

Feira de Santana, BA  
2011

**BALBINO LINO DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE  
FLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS SOBRE CÉLULAS DE  
GLIOBLASTOMA HUMANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Silvia Lima Costa

Feira de Santana, BA  
2011

Dedico este trabalho aos meus dois amores:  
minha esposa Lilian Lessa e à nossa linda  
filha Ângela Elizabeth.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me permitido estar na hora certa, com pessoas certas e poder aproveitar a oportunidade que Ele estava me oferecendo.

A Dra. Silvia Lima Costa, Profa. Associada da Universidade Federal da Bahia e minha orientadora, por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa, por ter creditado confiança ao me designar este importante trabalho, pela valiosa orientação prestada nas etapas de desenvolvimento deste projeto e principalmente pela valiosa amizade.

A todos os professores do curso de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec-UEFS/UFBA/FIOCRUZ), pelos valiosos ensinamentos que muito contribuíram para minha formação.

Aos Professores Fátima e Ramon El-Bachá pela orientação, ensinamentos e amizade.

Á colega Ana Rita, pela valiosa orientação prestada no desenvolvimento nos passos iniciais no LABNq-UFBA e, principalmente, pela amizade.

Aos colegas Vitor Diógenes, Bruno Pitanga e Mona Neves, pelo apoio técnico na realização dos ensaios e, acima de tudo, pela amizade.

Ao amigos Dr. Cláudio Figueira e Dra. Adriana, pesquisadores da Plataforma de Microscopia Eletrônica do CPqGM-FIOCRUZ, pela valiosa colaboração e atenção dispensada no processamento e análises de imagens, bem como pela valiosa amizade.

A todos os que fazem o Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular LabNq-UFBA, pela convivência e amizade firmada.

Ao Programa de Pós Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec-UEFS)

À coordenação do PPGBiotec, Sr. Helton, pela atenção e apoio prestado durante o curso de Doutorado.

Ao coordenador do PPGBiotec, Prof. Dr. Aristóteles, pelos ensinamentos, atenção e apoio prestados durante a minha formação doutoral.

Aos colegas de Doutorado, pela convivência e amizade firmada através dos momentos que percorremos juntos.

Ao Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, pelo apoio em disponibilizar o ambiente e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

A você, que provavelmente eu possa ter esquecido, muito obrigado.

“ A moral é a Lei Divina, Universal ou Natural, pela qual o ser humano deve reger suas ações no seu dia a dia de relações em cumprimento de todas outras leis naturais que regem o Universo”. A Arca, Fundação Ocidentemte.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ERK 1/2:** Proteína cinase reguladora do sinal extracelular
- CX-43:** Conexina 43
- DMEM:** Meio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO:** Dimetil sulfóxido.
- GBMs:** Glioblastomas multiformes
- GFAP:** Proteína ácida do gliofilamento (*Glial fibrillary acidic protein*).
- GL-15:** Linhagem de células de glioblastoma multiforme humano.
- ICQ:** Imunocitoquímica.
- LDH:** Lactato desidrogenase.
- MAPK:** proteínas cinase ativadas por mitogenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*).
- MEC:** Matriz extracelular
- MET:** microscopia eletrônica de transmissão
- MEV:** microscopia eletrônica de varredura
- MMP:** Matriz metaloproteinase
- MMP-2:** Matriz metaloproteinase tipo 2
- MMP-9:** Matriz metaloproteinase tipo 9
- MTT:** 3-(*-*dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio).
- OMS:** Organização Mundial de Saúde
- PBS:** Tampão fosfato salino.
- PBS-T:** Tampão fosfato salino com Tween 20.
- PVDF:** Membrana de fluoreto polivinilideno para transferência.
- SFB:** Soro fetal bovino.
- SDS:** Duodecil sulfato de sódio.
- SDS-PAGE:** Gel de poliacrilamida com duodecil sulfato de sódio.
- TBS:** Tampão tris salino.
- TBS-T:** Tampão tris salino com Tween 20.

# AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE FLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS SOBRE CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO

## RESUMO

Neste trabalho objetivamos investigar propriedades antitumorais de flavonóides polihidroxilados 5,7-dihidroxi-flavona (crisina), 3',4'-dihidroxi-flavona, 4',5,7-trihidroxi-flavona (apigenina), 3,4',5,7-tetrahidroxi-flavona (kaempferol), 3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona (quercetina), e 3-O-rutinosídeo de 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona (rutina) em células de glioblastoma multiforme humano, usando como modelo a linhagem de células GL-15. Em um primeiro estudo, investigamos o efeito do flavonóide rutina em células GL-15. Foi observado que rutina (50-100  $\mu$ M) reduziu a proliferação e a viabilidade de células GL-15, bem como os níveis de expressão de ERK1/2 fosforilada (P-ERK 1/2), e acúmulo das células na fase G2 do ciclo celular. Por outro lado, 87,4% das células expostas a 100  $\mu$ M de rutina entraram em apoptose, como revelado pela citometria de fluxo, após marcação com Anexina V/PI. Condensação nuclear e a fragmentação de DNA também foram observados, confirmando a ocorrência de apoptose. Além disso, as células remanescentes tratadas com 50  $\mu$ M de rutina apresentaram um padrão morfológico de diferenciação astrogliar em cultura, caracterizada pela presença de um corpo celular condensado e finos processos com expressão elevada de GFAP. Em um segundo estudo, investigamos o efeito de flavonóides polihidroxilados na viabilidade celular, modificação fenotípica e na capacidade invasiva e migratória em cultura de células GL-15. Nós observamos que os flavonóides crisina, apigenina e 3',4'-dihidroxi-flavona induziram uma significativa redução na viabilidade das células após 48 h de tratamento, além de mudanças ultraestruturais indicativas de apoptose. Os flavonóides avaliados também mostraram serem morfogênicos para células GL-15, induzindo um fenótipo com padrão de diferenciação astrogliar, caracterizada pela presença de um corpo celular condensado e finos processos citoplasmáticos, com expressão de GFAP. A análise por microscopia eletrônica de varredura também revelou uma redução de estruturas tipo filopodias na superfície celular, após tratamento com os flavonóides em estudo. Observamos que os flavonóides induziram um retardo na migração das células GL-15 em ensaios de migração após as primeiras 12 h de tratamento, bem como regularam a expressão de proteínas componentes da MEC, sendo observada marcação intra e extracelular para a fibronectina e marcação predominantemente intracelular para a laminina. Podemos também evidenciar que todos os flavonóides testados induziram uma redução na expressão e na atividade de MMPs, e que a expressão de CX43 foi reduzida após tratamento com rutina. Devido à capacidade de induzir a diferenciação, inibir migração celular e induzir a apoptose em cultura de células de glioblastoma humano, flavonóides polihidroxilados podem ser considerados como potentes candidatos para o tratamento de gliomas malignos. O conjunto dos resultados deste estudo, que demonstram que a rutina e flavonóides polihidroxilados possuem capacidade de induzir a diferenciação, inibir migração celular e induzir a apoptose em cultura de células de glioblastoma humano, sugere flavonóides como potentes candidatos a adjuvantes para o tratamento de tumores cerebrais malignos como glioblastoma multiforme.

**Palavras-chave:** flavonóides, glioblastomas, apoptose, diferenciação, MEC, MMP.



## [EVALUATION OF THE ANTITUMORAL POTENTIAL OF POLYHYDROXILIC FLAVONOIDS ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS]

### ABSTRACT

In this work, we investigated the effect of polyhydroxilic flavonoids 5,7-dihydroxiflavone (crisin), 3',4'-dihydroxyflavone, 4',5,7-trihydroxiflavone (apigenin), 3,4',5,7-tetrahydroxiflavone (kaempferol), 3,3',4',5,6-pentahydroxyflavone (quercetin), and 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside (rutin) on cell viability, phenotypic change, in migratory and invasive capacity in cultured of human glioblastoma multiform cells, using as a model the highly proliferative human cell line GL-15. In a first study we investigated the effects of the flavonoid rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside) on growth, viability and morphology of glioblastoma cells. We observed that rutin (50-100  $\mu$ M) reduced proliferation and viability of GL-15 cells, leading to decreased levels of ERK1/2 phosphorylation (P-ERK1/2) and accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle. On the other hand, 87.4% of GL-15 cells exposed to 100  $\mu$ M rutin entered apoptosis, as revealed by flow cytometry after AnnexinV/PI staining. Nuclear condensation and DNA fragmentation were also observed, further confirming that apoptosis had occurred. Moreover, the remaining cells that were treated with 50  $\mu$ M rutin presented a morphological pattern of astroglial differentiation in culture, characterised by a condensed cell body and thin processes with over expression of GFAP. In second study, we investigated the effects of rutin and the others polyhydroxylated flavonoids on viability, morphology, and structure of GL-15 glioblastoma cells, and also the effects on regulation of elements involved in cellular invasion, as cell migration, and expression of MEC, MMPs, and CX43. We observed that, measuring mitochondrial metabolism through MTT-teste, that flavonoids chrysin, apigenin and 3',4'-dihydroxyflavone induced a significative reduction in viability GL-15 cells, besides ultrastructural features of apoptosis. Flavonoids tested also induced morphological changes in GL-15 cells, which acquired a phenotype pattern of astrocytic differentiation, characterized by the presence of a condensed cell body and thin and long cellular processes, expressing GFAP. Scanning electron microscopy showed that flavonoids induced a reduction in filopodia-like structures on the cell surface of GL-15 cells. We found that flavonoids induced a delay in the migration capacity of glioblastoma cells, after the first 12 h after treatment, and cells exhibited increase in intra and extracellular expression fibronectin, and mainly intracellular expression of laminin. Moreover, we also observed that flavonoids induced reduction on MMP-2 expression and MMP activity, and a reduction on Cx43 expression after treatment with rutin. Taken together, these finds show that rutin and polyhydroxylated flavonoids can inhibit the growth, induce morphological changes or apoptosis, and regulate the expression of components involved in tumor cell migration and invasion, these molecules may be considered as potential adjuvants for therapy of CNS malignant tumor as glioblastomas.

**Keywords:** flavonoids, glioblastoma, apoptosis, differentiation, MEC, MMP

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	<b>14</b>
<b>1. Células gliais: aspectos estruturais e funcionais no Sistema Nervoso Central</b>	<b>14</b>
<b>2. Aspectos da biologia de gliomas malignos no snc</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Aspectos da interação celular de gliomas malignos no SNC via junções comunicantes</b>	<b>21</b>
<b>2.2. Matriz extracelular e invasão</b>	<b>23</b>
2.2.1. Matriz-metaloproteinases (MMPs)	25
2.2.2. Lamelipodias e filopodias	26
<b>2.3 Abordagens terapêuticas de gliomas malignos no SNC</b>	<b>28</b>
<b>3. Propriedades farmacológicas de flavonóides</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Características químicas e estruturais dos flavonóides</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Propriedades biológicas dos flavonóides em vertebrados</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Efeitos dos flavonóides no SNC</b>	<b>33</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>36</b>
Objetivo geral	36
Objetivos específicos	36
<b>CAPÍTULO 1: ANTIPROLIFERATIVE, PROAPOPTOTIC AND MORPHOGENIC EFFECTS OF THE FLAVONOID RUTIN ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS.</b>	<b>37</b>
[EFEITOS ANTIPROLIFERATIVO, PRO-APOPTÓTICO E MORFOGÊNICO DO FLAVONÓIDE RUTINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO]	
<b>RESUMO</b>	<b>37</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>39</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>40</b>
<b>2. Methods</b>	<b>41</b>
<b>2.1. Cell line and culture</b>	<b>41</b>
<b>2.2. Flavonoid and treatment</b>	<b>41</b>
<b>2.3. Cell viability and proliferation</b>	<b>42</b>
LDH activity	42
Trypan blue staining	42
Thymidine incorporation	42

Flow Cytometry	43
Western blot analysis for MAPK signalling	43
<b>2.4. Morphological changes and differentiation</b>	<b>44</b>
Rosenfeld's staining and immunocytochemistry	44
Protein assay and western blotting	45
<b>2.5. Apoptosis detection</b>	<b>45</b>
Annexin V analysis	45
Chromatin staining	46
Single cell electrophoresis assay of DNA	46
<b>2.6. Statistical analysis</b>	<b>47</b>
<b>3. Results</b>	<b>47</b>
Cell viability and growth	47
Modulation of GL-15 cell morphology and expression of vimentin and GFAP	49
Induction of apoptosis in glioblastoma cells	50
<b>4. Discussion</b>	<b>50</b>
<b>5. References</b>	<b>54</b>
<b>Figure Legends</b>	<b>58</b>
<b>Figure 1 – Effect of rutin on viability and proliferation of GL-15 cells.</b>	<b>60</b>
<b>Figure 2 – Effect of rutin on morphology and on vimentin and GFAP expression in GL-15 cells.</b>	<b>61</b>
<b>Figure 3 – Induction of apoptosis by rutin in human GL-15 cells as revealed by flow cytometry.</b>	<b>64</b>
<b>Figure 4 – Features of apoptosis in GL-15 cells after rutin exposure.</b>	<b>65</b>
<b>CAPÍTULO 2: EFEITOS <i>IN VITRO</i> DE FLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS NA VIABILIDADE, MIGRAÇÃO E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO.</b>	<b>66</b>
<b>RESUMO</b>	<b>66</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>67</b>
<b>2. Materiais e Métodos</b>	<b>68</b>
<b>2.1. As drogas e tratamentos</b>	<b>69</b>
<b>2.2. Culturas de células</b>	<b>69</b>
<b>2.3. Teste de citotoxicidade e viabilidade celular</b>	<b>70</b>

<b>2.4. Análises morfológicas e estruturais</b>	<b>70</b>
Microscopia com contraste de fase	71
Marcação imunocitoquímica	71
Microscopia eletrônica de varredura (MEV).	72
<b>2.5. Expressão de componentes de MEC</b>	<b>73</b>
Marcação imunocitoquímica	73
Western blot	74
<b>2.6. Expressão e atividade de matriz-metaloproteinases (MMPs)</b>	<b>75</b>
Western blot	75
Imunocitoquímica	76
Zimografia	76
<b>2.7. Análise da migração celular</b>	<b>77</b>
Ensaio de lesão em monocamada de células	77
<b>2.8. Análise da expressão de conexina 43 (CX-43)</b>	<b>78</b>
Imunocitoquímica	78
<b>2.9. Investigação de modificações ultraestruturais em células GL-15</b>	<b>78</b>
Microscopia eletrônica de transmissão (MET).	78
<b>3. Análise estatística dos resultados</b>	<b>79</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>79</b>
<b>4.1. Efeito citotóxico dos flavonóides sobre as células GL-15</b>	<b>79</b>
<b>4.2. Efeito dos flavonóides sobre a viabilidade das células GL-15</b>	<b>80</b>
<b>4.3. Efeito dos flavonóides na morfologia e estrutura de células GL-15</b>	<b>80</b>
<b>4.4. Investigação do potencial anti-invasão de flavonóides</b>	<b>81</b>
<b>4.5. Efeito dos flavonóides na ultraestrutura de células GL-15</b>	<b>83</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>84</b>
<b>6. REFERÊNCIAS</b>	<b>94</b>
<b>Quadro 1- Flavonoides testados em culturas de células de glioblastoma da linhagem GL-15.</b>	<b>106</b>
<b>Figura 1- Análise da citotoxicidade dos flavonóides em células GL-15 pelo teste do MTT.</b>	<b>107</b>
<b>Figura 2- Efeito de flavonóides polihidroxilados na viabilidade de células GL-15 pela coloração com azul de Tripan.</b>	<b>108</b>
<b>Figura 3- Análise por microscopia em contraste de fase e</b>	<b>109</b>

<b>imunomarcção para a proteína GFAP em células da linhagem GL-15</b>	
<b>Figura 4- Análise por microscopia eletrônica de varredura de células da linhagem GL-15</b>	<b>111</b>
<b>Figura 5- Ensaio de migração em monocamada de células GL-15</b>	<b>113</b>
<b>Figura 6- Imunomarcção das proteínas de MEC fibronectina e laminina, expressas a nível extracelular, em células GL-15</b>	<b>115</b>
<b>Figura 7- Imunomarcção das proteínas de MEC fibronectina e laminina expressas em células GL-15</b>	<b>117</b>
<b>Figura 8- Análise por western blot da expressão de laminina e fibronectina em culturas de células da linhagem GL-15</b>	<b>119</b>
<b>Figura 9- Imunomarcção das MMP-2 expressas em células GL-15</b>	<b>120</b>
<b>Figura 10- Análise por western blot da expressão das MMP-2 em culturas de células da linhagem GL-15</b>	<b>122</b>
<b>Figura 11- Análise zimográfica da atividade gelatinase de MMPs e em culturas de células da linhagem GL-15</b>	<b>123</b>
<b>Figura 12- Imunomarcção de Cx-43 expressas em células GL-15</b>	<b>124</b>
<b>Figura 13- Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem GL-15.</b>	<b>126</b>
<b>CONCLUSÕES</b>	<b>128</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>129</b>
<b>REFERENCIAS GERAIS</b>	<b>130</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>145</b>

## **INTRODUÇÃO GERAL**

### **1. Células gliais: aspectos estruturais e funcionais no SNC**

No Sistema Nervoso Central (SNC) os gliócitos (ou células da glia) são muito mais numerosos que os neurônios, apresentando diferentes tipos morfológicos. O corpo celular geralmente é menor que o dos neurônios, com seu núcleo ocupando grande parte do corpo celular. Os gliócitos não apresentam axônios, e seus prolongamentos podem fazer contato com capilares sanguíneos e outras células do sistema nervoso, estabelecendo assim uma forma de manter o metabolismo (LENT, 2005). Estas células são caracterizadas funcional e morfológicamente em oligodendrócitos, microglia e astrócitos. Os oligodendrócitos possuem prolongamentos celulares, formando expansões que são fundamentais para a formação da bainha de mielina em torno dos axônios centrais, garantindo a rápida e eficiente condução do impulso nervoso. As células da microglia, por outro lado, são consideradas como as células imuno-efetoras do SNC, e têm sido implicadas nos mecanismos de patogênese de diferentes doenças neurodegenerativas como o Mal de Alzheimer, Doença de Parkinson, Esclerose Múltipla, e Demência associada à AIDS (DICKSON et al., 1993). Outros estudos têm mostrado o envolvimento da microglia na migração e invasão de gliomas (SLIWA et al., 2007). Trabalhos têm postulado que a função de defesa das células da microglia contra glioma são comprometidas pelo tumor devido, por exemplo, a expressão de moléculas de MHC classe II danificada (FLUGEL et al., 1999; SCHARTNER et al, 2005). A microglia pode facilitar a sobrevivência do neurônio pela secreção de substâncias neurotróficas, ou através da ativação de astrócitos, sendo igualmente capaz de liberar fatores neurotóxicos (GIULIAN et al., 1994).

Os astrócitos constituem cerca de metade de toda a população glial. Estas células possuem inúmeros prolongamentos que emergem do corpo celular e que se ramificam profusamente formando uma densa arborização (LENT, 2005). Os astrócitos geralmente são reconhecidos pela expressão característica de proteínas do citoesqueleto, tais como a proteína ácida fibrilar glial (GFAP [glial fibrillary acidic protein]) e vimentina, bem como pela presença da proteína S100B (proteína ligante de cálcio), e da enzima glutamina sintetase (NONES et al., 2010). Essas células são

particularmente fundamentais para o aporte de nutrientes do sangue para as células nervosas e para o controle das concentrações de íons no meio extracelular e armazenamento de glicogênio; participam ainda dos mecanismos de cicatrização e de defesa imunitária nas lesões ou infecções do tecido nervoso e dos fenômenos de detoxicação cerebral (NONES et al., 2010; TARDY et al., 1981; TARDY, 1991). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que interação astrócito-neurônios são essenciais para a sobrevivência e função dos neurônios. A secreção extracelular de componentes da matriz, como fibronectina e laminina pelos astrócitos é fundamental para a determinação de polaridade neuronal, o crescimento axonal, a diferenciação das células-tronco, a migração e a proliferação neuronal (GOMES et al., 2001; ALVAREZ-BUYLLA & GARCIA-VERDUGO, 2002; CHRISTOPHERSON et al., 2005).

No SNC, as duas populações celulares que são capazes de reagir a injúrias causadas aos neurônios, seja alterando suas morfologias seja modificando os padrões de expressão de fatores neurotróficos e/ou neurotóxicos, ou ainda, a associação desses dois fenômenos, são os astrócitos e a microglia (STREIT et al., 1999). Sabe-se pouco a respeito das interações entre estes dois tipos celulares, mas já é conhecido que os astrócitos influenciam algumas atividades da microglia e vice-versa, principalmente no que se refere à produção de substâncias, como citocinas, por exemplo. Após danos no sistema nervoso, os astrócitos invariavelmente proliferam, sofrem extensiva hipertrofia do núcleo, do corpo e dos processos celulares, e desenvolvem fibrose pelo aumento da expressão da GFAP, sendo este estado conhecido como gliose ou astrogliose reativa. Entretanto, esse processo não é estereotípico, podendo variar em extensão, tempo de desenvolvimento, grau de hipertrofia ou hiperplasia e outras propriedades, dependendo da natureza da lesão e da área específica afetada do SNC (MONTGOMERY, 1994; COOKSON & PENTREATH, 1994; ASCHNER, 1998; MEAD & PENTREATH, 1998; GOMES et al., 1999; AULD, et al., 2003).

A astrogliose é geralmente detectada antes de um efeito tóxico em neurônios e, portanto, pode ser considerada como um marcador precoce de neurotoxicidade (O'CALLAGHAN, 1991; MONNET-TSCHUDI et al., 1995). Além da GFAP, astrócitos reativos alteram a expressão de uma variedade de proteínas, incluindo a proteína dos filamentos intermediários vimentina, a enzima glutamina sintetase (GS) e várias

citocinas (NONES et al., 2010; EDDLESTON & MUCK, 1993). Modificações nos astrócitos podem ser usadas como marcadores para vários tipos de danos no SNC. Em particular, a astrogliose ocorre devido a danos físicos (MC GRAW et al., 2001; COSTA et al., 2002; RAGHUPATHI, 2004), exposição a substâncias tóxicas, tais como 5,7-dihidroxitriptamina (FRANKFURT et al., 1991) ou ácido caínico (RATABOUL et al., 1989), e também em alguns estágios de doença inflamatórias desmielinizantes e genéticas do SNC (NORTON et al., 1992). As inter-relações entre células gliais e neurais não só contribuem para o desenvolvimento, função e capacidade reparativa do cérebro, mas também podem participar na sua deterioração devido à senescência ou doença (DAVIES et al., 2000).

Segundo Rutka & Smith (1993), os astrócitos podem reagir e proliferar após injúria cerebral e ter a mais alta predisposição à transformação maligna. Nos danos no SNC, bem como durante desenvolvimento intacto do cérebro, o crescimento de axônios ocorre na presença de astrócitos, que lhes servem como guia (CLEMENT et al., 1998; GARWOOD et al., 1999; COSTA et al., 2002; NADARAJAH, 2003).

Assim como os astrócitos, as células microgliais assumem várias aparências morfológicas que podem ser correlacionadas a estágios funcionais distintos. Tais alterações morfológicas e/ou funcionais destas células caracterizam sua reatividade, num fenômeno conhecido como microgliose. Estas células tanto podem facilitar a sobrevivência dos neurônios, pela secreção de substâncias neurotróficas e ativação dos astrócitos (GIULIAN et al., 1994), como, também, estão associadas a doenças neurodegenerativas como mal de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, demência associada a AIDS (DICKSON et al., 1993). Ainda, já foi demonstrado que a ativação da microglia, independentemente de sua etiologia, desempenha um papel crucial na denominada resposta imune inata, i.e. uma reação independente do recrutamento de linfócitos imunocompetentes, e que representa um estado fisiopatológico comum para diferentes desordens do SNC (ALOISI, 2001).

A microglia ativada pode produzir citocinas que têm efeito pró-regenerativo, como a IL-6 e o TGF $\beta$ , assim como as citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e a IL-1 (STREIT et al, 1988 apud STREIT, WALTER & PENNEL, 1999). Tais citocinas agem como mediadores em danos celulares, induzindo proliferação de astrócitos e de



células microgliais (HAO et al., 2002). O óxido nítrico é outro importante fator produzido pela microglia e astrócitos ativados. Considerado como potente mensageiro biológico, o NO é um radical livre de vida curta que media uma variedade de funções biológicas, incluindo homeostasia vascular, neurotransmissão, ação microbicida, atividade antitumoral e citotoxicidade. Este gás, quando liberado, pode se combinar com o peróxido ou o superóxido de hidrogênio, produzindo radicais peroxinitritos altamente reativos (DAWSON & SNYDER 1994; MANNING et al., 2001). Entretanto, apesar desta função imunoprotetora, estudos recentes têm mostrado o envolvimento da microglia/macrófagos na proliferação de gliomas malignos (ZHAI, HEPPNER & TSIRKA, 2011).

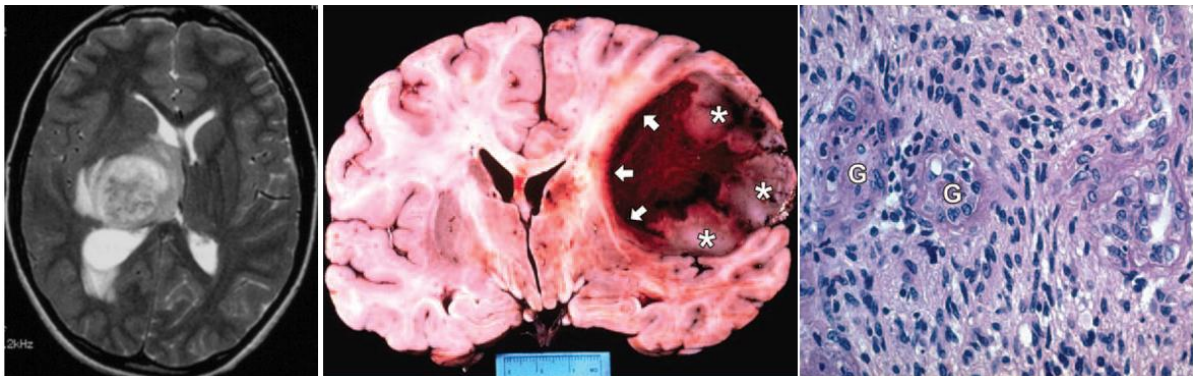
## **2. Aspectos da biologia de gliomas malignos**

As células gliais podem se transformar em gliomas com diferentes graus de malignidade (KLEIHUES, BURGER & SCHANEIDER, 1993). A atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) separa os gliomas astrocíticos em duas categorias principais, sendo um grupo muito comum de tumores com infiltração difusa (astrocitoma difuso, astrocitoma anaplásico e glioblastoma) e um segundo grupo menos comum de neoplasias astrocitárias com um crescimento geralmente mais circunscrito (astrocitoma pilocítico e xantastrocitoma pleomórfico) (REIFENBERGER & COLLINS, 2004). No ser humano adulto, os astrocitomas difusos de baixo grau (World Health Organization, grau II), evoluem inevitavelmente para tipos histológicos de tumor mais malignos, tais como astrocitoma anaplásico (WHO grau III) e/ou para glioblastoma (WHO grau IV), neste caso conhecido como glioblastoma secundário. O termo glioblastoma primário se aplica a um tumor glial que se desenvolve sem uma lesão tumoral antecedente (REIFENBERGER & COLLINS, 2004; KLEIHUES, BURGER & SCHANEIDER, 1993).

A incidência de tumores cerebrais em todo o mundo é de cerca de 7 em cada 100.000 habitantes por ano. Os glioblastomas podem se desenvolver em qualquer idade, mas a grande maioria dos casos ocorrem em pacientes adultos com idade entre 50 e 70 anos (REIFENBERGER & COLLINS, 2004). Este tumor está localizado freqüentemente nos lobos frontais, seguidos dos temporais e parietais ocupando

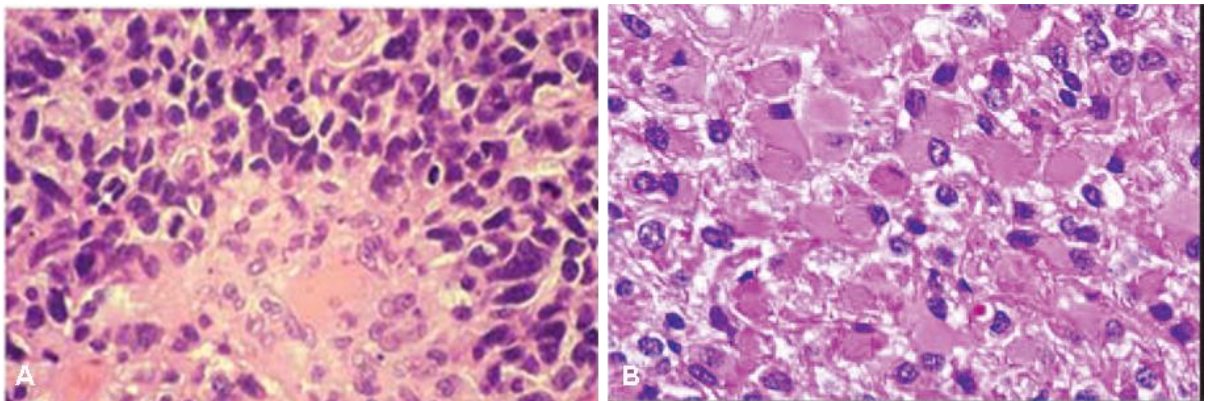
geralmente o centro branco medular, podendo atingir mais de um lobo, provocando freqüentemente assimetria dos hemisférios, alargamento dos giros correspondentes e distorção do sistema ventricular (DAUMAS-DUPOINT et al., 1988; KLEIHUES, BURGER & SCHNEIDER, 1993). Pacientes com glioblastoma apresentam um prognóstico muito pobre, com sobrevida média relatada entre 9 e 11 meses, apesar da terapêutica moderna (COLLINS, 2002).

O aspecto macroscópico dos diversos tipos de glioblastoma varia consideravelmente, não sendo possível encontrar limites nítidos entre o tumor e os tecidos cerebrais vizinhos. Quanto ao crescimento, ocorre geralmente ao longo das fibras nervosas, podendo haver propagação para o hemisfério inteiro e também para o hemisfério oposto através do corpo caloso. O tecido neoplásico é friável, sem brilho, granuloso, acinzentado, salpicado de focos hemorrágicos e de necrose (Fig. 1), tornando-se exclusivas estas características ao tumor (REIFENBERGER & COLLINS, 2004; COTRAN, et al., 2007).



**Figura 1-** Imagens por ressonância magnética e corte histológico de glioblastoma multiforme. Da direita para a esquerda: padrão em disco necrótico de glioblastoma visualizado por ressonância magnética; angiograma lateral obtido após injeção de contraste em carótida, evidenciando uma grande hipervascularização irregular, com coleção do material de contraste (setas) e borda externa da região cortical do tumor (\*)irregular e com uma margem externa fina, uma aparência mais típica de glioblastoma multiforme; coloração H-E de corte histológico, podendo ser visualizados vasos *glomeruloides* em G (aumento original×250). (Adaptado de SMIRNIOTOPOULOS et al., 2007).

O aspecto histológico peculiar do glioblastoma multiforme é a presença de proliferação de células imaturas, pequenas, arredondadas, com citoplasma de limites imprecisos (Fig. 2). Estes tumores são compostos por células de várias morfologias, incluindo astrócitos fibrilares e gemistocíticos (com citoplasma volumoso, vítreo e eosinofílico), com células de aspecto fusiformes, anaplásicas e pleomórficas. Observam-se também células gigantes multinucleadas, e muitas das células apresentando marcante atipia nuclear, com núcleos irregulares, excêntricos e de aspectos morfológico irregular, e alta atividade mitótica (MILLER & PERRY, 2007). É característico também, além da variabilidade do quadro histológico, a presença de áreas de necrose, rodeadas por células tumorais dispostas em pseudopaliçada (MILLER & PERRY, 2007; REIFENBERGER & COLLINS, 2004; COTRAM, 2007).



**Figura 2-** Coloração pelo H&E de glioblastomas. A: Glioblastoma de grau WHO IV. Alta celularidade, com células pleomórficas com atividade mitótica; (Adaptado de REIFENBERGER & COLLINS, 2004). B: Glioblastoma multiforme gemistocítico, com células de morfologia variada, eosinofílicas, citoplasma volumoso e núcleo excêntrico e com morfologia irregular (Adaptado de MILLER, 2007).

A análise por microscopia eletrônica mostra que a maioria das células de glioblastoma pertencem à linhagem astrocítica, com diferentes graus de diferenciação, vascularização abundante, representado por capilares e vasos de

pequenos e médios calibres, paredes mal formadas, não se distinguindo as artérias das veias. A proliferação vascular, freqüente nos glioblastomas, depende de fatores mitogênicos tal como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), e induzem a síntese de DNA nas células neoplásicas, através de receptores de superfície específicos para os mesmos. Esta característica associada à presença constante de necrose, e que contrariamente são pouco freqüentes nos astrocitomas anaplásicos, está de acordo com observações recentes que consideram o aspecto histológico como um indicador fidedigno da atividade proliferativa do glioblastoma e do seu comportamento biológico mais agressivo (ROWLAND, 1986; BRASILEIRO-FILHO et al., 1994; COTRAN et al., 2000; PORTO, 2001).

Fatores imunes também têm sido associados à progressão e invasão de gliomas: a secreção de interleucina 10 (IL-10), citocina de atividade imunossupressora, bem como dos fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e o fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), tem sido relacionados à progressão de tumores gliais, especialmente aumentando a proliferação celular, estimulação de angiogênese, migração e invasão, o que promove a infiltração para tecidos adjacentes (FREITAS, et al., 2011; HUETTNER et al., 1997).

A degradação de componentes da matriz extracelular (MEC) é um dos primeiros passos no processo de invasão, a qual se dá essencialmente através de endopeptidases conhecidas como matriz-metaloproteinases (MMPs), e cujo aumento da expressão tem sido demonstrado estar implicado no crescimento, invasão e metástase de tumores (HIDALGO et al., 2001; PLANCHENAULT et al., 2001). Em particular, o aumento da expressão de gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9) tem sido associada a gliomas malignos. A atividade das MMPs é regulada por inibidores tissulares específicos (TIMPs) que atuam ao nível de transcrição gênica, ativação proteolítica de zimogênios e inibição de formas ativas. Assim, a regulação do balanço MMP/TIMP pode ser um fator crítico para a remodelação da MEC e invasão do tumor, e a ruptura deste balanço pode estar envolvida na biologia de gliomas malignos.

O glioblastoma humano é, por definição, heterogêneo, o que levou vários pesquisadores a tentarem melhor caracterizar as diversas formas deste tumor e, de

forma geral, marcadores específicos de origem glial são utilizados com este objetivo (MCCOMB et al., 1984; BILZER et al., 1991; U et al., 1995; WESTPHAL et al., 1990). Essencialmente, dois marcadores, a GFAP e a vimentina, ambas componentes principais dos filamentos intermediários das células gliais, foram amplamente caracterizadas nos glioblastomas. A GFAP é comumente considerada como um dos principais marcadores da diferenciação astrocitária (LANDRY et al., 1990; HO et al., 1996; RUTKA et al., 1997). A vimentina, ao contrário, é expressa principalmente em astrócitos imaturos, mas, *in vitro*, podendo persistir sua co-expressão com a GFAP (SOFRONIEW, 2005; NONES et al., 2010; LENDHAL et al., 1990).

## **2.1. Aspectos da interação celular de gliomas malignos no SNC via junções comunicantes**

As células que formam um tecido interagem continuamente para coordenar as funções normais deste tecido e manter a homeostasia. As comunicações juncionais tipo *gap* (CJG), formadas por uma família de proteínas conhecida como conexinas, permite este tipo de interação entre as células resultando em um ambiente tecidual sincronizado e cooperativo. A maioria dos tipos celulares do cérebro expressam CJGs (SOHL, MAXEINER & WILLECK, 2005). As conexinas são vulgarmente designadas com sufixos numéricos que refere-se ao peso molecular da seqüência em kilodaltons (kDa), como por exemplo a conexina 43 ou Cx43, que pesa 43kDa. As conexinas são diferencialmente expressas nos tecidos com algumas sendo significativamente expressas em apenas alguns tecidos e outras, como Cx43, sendo mais difundida em muitos tecidos (SOLAN & LAMPE, 2005; RUAN et al., 2010). A conexina 43 (Cx43) é a proteína mais abundante nas junções comunicantes do SNC, e é expressa primariamente em astrócitos (SOROCEANU et al., 2001).

Evidências em tumores periféricos tal como melanomas têm revelado o envolvimento de junções tipo *gap* na migração celular (HSU et al., 2000). Por outro lado, muitas linhagens tumorais revelaram ser deficientes ou aberrantes para a expressão de CJG e/ou deficientes na expressão de conexinas, e que o restabelecimento da expressão de conexinas/CJG está correlacionado com o aumento do controle do crescimento tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KING & BERTRAM,

2005). Em consistência com esta hipótese, foi demonstrado que retinóides e carotenóides regularam positivamente a expressão de Cx43 em uma proporção direta à suas habilidades em inibir a tumorigênese de células leucêmicas (HOSSAIN et al., 1989; ZHANG, COONEY & BERTRAN., 1991).

O processo de invasão de gliomas dentro do parênquima cerebral parece acontecer através de uma via não destrutiva (BERNSTEIN, 1996), o que sugere que células de glioblastoma humano em invasão podem estabelecer relações de cooperação com o seu ambiente em particular com as células residentes do cérebro. Ainda, tem sido demonstrado que astrócitos e células de glioblastoma realizam comunicações entre si através de junções tipo *gap* via conexina 43, que estão relacionadas a uma transformação fenotípica dos astrócitos e que pode tornar o parênquima do cérebro permissivo para a invasão de glioma (OLIVEIRA 2005; ZHANG et al., 1999).

Por outro lado, recentes trabalhos têm demonstrado que a inibição de junções comunicantes CJC em esferóides de células de glioblastoma induzia aumento na motilidade destas células, sugerindo assim a contribuição destas junções na invasão dos gliomas no parênquima cerebral (OLIVEIRA et al., 2005). Estudos utilizando células e tecidos neoplásicos têm sido particularmente úteis como modelos de migração celular. Inicialmente, estes estudos tinham em comum o estabelecimento de uma correlação negativa entre o grau de acoplamento juncional homocelular com a invasividade e proliferação de células tumorais (ELIAS E FRIEND, 1976; NAVOLOTSKI *et al.*, 1997; HAMADA *et al.*, 1998; NAUS E BANI-YAGHOUB, 1998; MCDONOUGH *et al.*, 1999; LI E HERLYN, 2000). Em gliomas, os níveis de conexina 43 e, conseqüentemente o grau de acoplamento intercelular encontram-se reduzidos (ZHUET *al*, 1991; MCDONOUGH *et al.*, 1999), enquanto que a superexpressão de conexina 43 induz à reversão do fenótipo tumoral (NAUS *et al.*, 1992). Ao comparar o grau de severidade metastásica entre diferentes linhagens tumorais humanas, Navolotski e cols. (1997) demonstraram que o desenvolvimento tumoral (migração e proliferação) estava relacionado à redução dos níveis de comunicação celular. Assim, o importante papel de CJC e conexinas no desenvolvimento de tumores apontam uma possibilidade destas proteínas como potenciais alvos anti-oncogênicos para a quimioprevenção e/ou quimioterapia. Desta forma, torna-se

importante a compreensão do papel destes tipos de junções na progressão do tumor, bem como as interações entre células tumorais e células gliais do tecido infiltrado pelo tumor.

## **2.2. Matriz extracelular e invasão**

A primeira barreira a qual as células tumorais cerebrais se submetem quando expressam o fenótipo invasivo é a matriz extracelular (MEC). Para invadir localizações distantes, as células tumorais cerebrais necessitam de propriedades que a permitam invadir a MEC cerebral. Sugere-se que proteínas específicas da MEC influenciem na morfologia celular através de interações químicas e mecânicas com a membrana plasmática. Embora as propriedades e os conteúdos da MEC cerebral não estejam completamente conhecidos, sabe-se que a MEC é constituída de compostos amorfos como, colágeno, fibronectina, laminina, hialuronidase (HA) e glicosaminoglicanos (GAG) (Yasuhiko, et. al., 2001). A progressão do glioblastoma envolve uma complexa inter-relação entre células tumorais e o ambiente na periferia do tumor. Existe uma forte propensão das células de gliomas malignos em dispersar-se por todo tecido cerebral, levando a doença responder pobremente a ressecções cirúrgicas, radioterapia e quimioterapias correntes (CHRISTOPHER, et. al., 2008).

A invasão conta com mecanismos de interação celular com a MEC assim como alterações na composição da mesma. Embora os glioblastomas multiformes (GBMs) mostrem altos padrões bem sucedidos de invasão dentro do tecido cerebral normal, é rara a metástase fora do cérebro. A infiltração ao interior do cérebro normal pelo gliomas é um processo não aleatório, tendo a substância branca como local preferencial, seguindo por espaços perivasculares e subependimário. Estas preferências anatômicas sugerem a importância da interação entre migração celular e seu microambiente (NAKADA, 2007). Desta forma, a compreensão dos mecanismos que modulam a invasão de gliomas irão contribuir para determinação de estratégias e alvos terapêuticos mais eficazes. Terapias que atinjam efetivamente alvos associados a invasão de gliomas, poderão melhorar o quadro clínico de pacientes com glioblastoma (LIN, et al., 2008; NAKADA, 2007).

Outro aspecto interessante e pouco explorado é a regulação do volume e da forma que as células de GBMs adquirem para os processos migratórios. Recentes trabalhos demonstraram que a regulação dos íons  $Cl^-$  e  $K^+$ , regulam a entrada de água em gliomas, sendo esta também uma importante ação celular em processos migratórios, pois está associada na determinação da forma e volume celular, contribuindo na ultrapassagem de barreiras físicas no espaço extracelular. Esses estudos revelaram que gliomas adquirem um fenótipo alongado, de forma triangular e aparente retração do volume celular (MICHAEL, et.al., 2008).

Sabendo-se que as proteínas que compõem a matriz extracelular (MEC) desempenham um papel significativo na migração de células durante o desenvolvimento fetal, estas também podem estar envolvidas no mecanismo de invasão das células tumorais. As proteínas fibronectina e laminina estão envolvidas na indução de migração celular fetal durante o desenvolvimento de células neurais, mas atualmente existem evidências suficientes que mostram que células tumorais participam ativamente na degradação proteolítica da MEC e que as metaloproteinases (MMPs) têm um papel complexo no câncer (CHINTALA et al, 1999; RAO et al., 1996). Esta degradação proteolítica da MEC é necessária para a migração celular em processos fisiológicos e patológicos. A elevada expressão de MMPs por células de glioma tem sido associada com a progressão maligna deste tumor (CHINTALA et al., 1999; PLANCHENAULT et. al., 2001).

Um dos requisitos para migração celular é a cuidadosa coordenação entre a adesão e o desligamento da adesão com os componentes da MEC cerebral. No cérebro, a MEC pode ser vista como uma estrutura física que atua como barreira e, também se envolve de forma a interferir na capacidade de invasão das células de glioma. A MEC pode promover ou inibir a locomoção ativa das células onde as proteínas medeiam vários efeitos diferentes. O espaço extracelular representa cerca de 20% do volume total do cérebro e a maioria das proteínas da MEC no cérebro humano estão localizadas no compartimento onde o movimento ativo das células de glioma ocorre, o espaço perivascular (fibronectina, laminina, colágeno e vitronectina) e o parênquima cerebral (ácido hialurônico e glicosaminoglicanos) (NAKADA, et al., 2007).



### 2.2.1. Matriz-metaloproteinases (MMPs)

Um grande número de genes de matriz metaloproteases (um pouco mais de 20 genes), já foram identificados em humanos, muitas dos quais sendo implicados na progressão de tumores (NGUYEN, ARKELL & JACKSON, 2000; TAKINO et al., 2004). As matriz-metaloproteinases (MMPs) são enzimas secretadas de forma latente e exigem ativação para agirem em seus substratos. A proteólise é rigidamente controlada para evitar danos aos tecidos. As MMPs desempenham múltiplas funções, sendo uma das mais marcantes a degradação de componentes da MEC, podendo promover a migração de células normais e tumorais. Elas são secretadas para a MEC, onde atuam como mediador entre células e matriz extracelular (ROSENBERG, 2009). As MMPs são uma família de enzimas que compartilham uma estrutura comum, que é composta por quatro domínios principais: o propeptídeo catalítico, ligante de haemopexina, e os domínios transmembrana. O domínio propeptídico contém um resíduo de cisteína, que se liga ao zinco no sítio ativo para formar a chave cisteína. A ligação de cisteína nos blocos do domínio catalítico no sítio de zinco ativo, mantém o estado latente ou inativo da enzima.

As MMPs estão divididas em quatro subgrupos principais com base na estrutura de domínio: collagenases, gelatinases, estromelinas, e MT1-MMPs. Collagenases degradam colágenos fibrilares, que são os principais componentes dos ossos e cartilagens (ROSEMBERG, 2009). No cérebro, as gelatinases A e B (MMP-2 e MMP-9, respectivamente) têm sido as mais intensamente estudadas por causa da facilidade com que podem ser identificadas por ensaios zimográficos. Elas atuam degradando proteínas da lâmina basal em torno dos capilares, facilitando a angiogênese e a neurogênese, e contribuindo para instigar a morte celular. Existem várias famílias de enzimas líticas da MEC, sendo a ampla maioria delas representada pelas metaloproteinases (MMP).

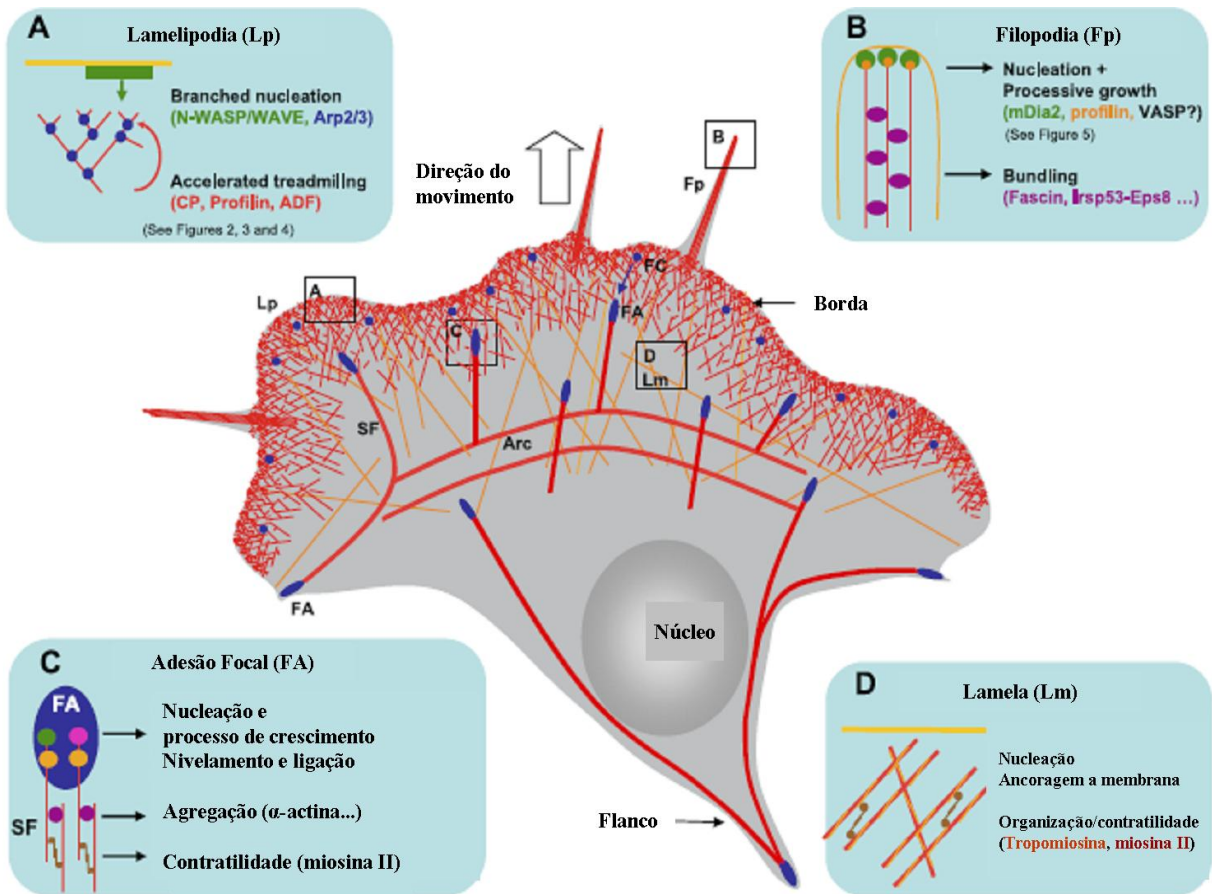
A elevada expressão MMPs pelas células tumorais tem sido associada com a sua progressão maligna. Achados de superexpressão, especialmente das gelatinases A (MMP-2) e B (MMP-9), foram associados com os gliomas malignos (SEIKI & YANA, 2003; FOLGUERA et al, 2004). A atividade de MMPs é regulada a nível da transcrição genética de proteínas proteolíticas que ativam o zimogênio e a

inibição das formas ativas dos inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs). MMP-2 tem um mecanismo de superfície celular único de ativação envolvendo seu preferencial inibidor TIMP-2 e uma membrana tipo MMP (MT-MMP). Assim a regulação deste equilíbrio MMP/TIMP pode ser crítica para o remodelamento da MEC e a ruptura deste equilíbrio pode estar envolvida com a biologia de gliomas malignos (VINCE, et al., 1999). Em conjunto, estes dados indicam que as MMPs representam importantes alvos contra os quais novas drogas anticancerígenas potenciais poderiam ser desenvolvidas (NGAMENI et al., 2006). Em um modelo *ex vivo* de fatia do cérebro de rato, foi observado que a microglia facilitava a invasão do glioblastoma multiforme, secretando matriz metaloproteinases inativas (pro-MMP2) (MARKOVIC et al., 2005). Por outro lado, células de glioblastoma multiforme, produzem fatores solúveis que ativam pro-MMP2, aumentando assim a quantidade de MMP2 ativa, que promove a invasão do glioma (MARKOVIC et al., 2005). Esta cooperação intercelular reflete também a constatação de que em co-culturas de células de glioblastoma multiforme e astrócitos, há um aumento da atividade MMP-2 (LE et al., 2003), o que sugere que os astrócitos são capazes de desempenhar um importante papel também na invasão de glioblastomas. Coletivamente, estes dados sugerem que a progressão do glioblastoma envolve complexas interações entre as células tumorais e o microambiente peritumoral, proteínas secretadas, remodelamento do ambiente e a participação de células normais peritumorais.

### 2.2.2. Lamelipodias e filopodias

A migração celular desempenha um papel chave em muitos processos fisiológicos e patológicos. O processo migratório da célula é altamente orquestrado em várias etapas. Para migrar, a célula precisa primeiro adquirir uma morfologia polarizada em resposta a sinais e estímulos extracelulares. Estes sinais induzem a polimerização de unidades de actina e a formação de extensões da membrana plasmática chamadas de lamelopodia, e a formação de saliências mais finas chamadas de filopodia (CLAINCHE & CARLIER, 2008; Gardel, Schneider, Aratyn-Schaus & Waterman, 2010). Na extremidade das lamelopodias, encontram-se regiões associadas a aderência, a ancoragem do corpo celular a matriz extracelular. Para se movimentar, a célula retrai sua borda arrastando o corpo celular, a partir da

combinação de processos de aderência e contratilidade e desmontagem das ligações na parte traseira (Fig. 3).



**Figura 3-** Esquema proposto do processo de migração celular apresentando as principais estruturas encontradas **A:** mostrando organização de filamentos de actina na formação de lamelipodia na membrana plasmática, dependente de sinais responsivos específicos. **B:** durante a migração de células, as células se estendem para formar saliências digitiformes, denominadas filopodia, além das pontas salientes da lamelipodia, que funcionam como sensores a estímulos do ambiente. **C:** células de movimento lento formam adesões focais em resposta a sinalizações específicas. Estas adesões focais fazem contato com a matriz extracelular através de feixes contráteis de filamentos de actina, miosina II, e proteínas de agregação incluindo a  $\alpha$ -actina. **D:** proteínas que fazem parte da lamela. Lp, lamelipódio; Fp, filopódio; Lm, lamela; SF, fibra de stress; FA, adesão focal; FC, complexo focal. (Adaptado de CLAINCHE & CARLIER, 2008).

A borda da lamelipodia principal é intercalada com a filopodia (feixes de filamentos de actina, que se projetam para a frente). Semelhante a lamelipodia, os filamentos de filopodia são polarizados com suas extremidades seguindo na direção da saliência, mas em contrário dos lamelipodia, os filopodias são paralelos, longos e modelam-se muito lentamente. Apesar de serem regulados por diferentes vias de sinalização, estão intimamente ligados, porque os feixes de filopodia emergem da rede de lamelipodia (MOGILNER & RUBINSTEIN, 2005).

Alguns trabalhos tem mostrado que a inibição de migração e invasão de tumores têm sido associados a uma redução ou inibição da formação de lamelipodias e filopodias (HWANG, SMITH, SALHIA & RUTKA, 2008; CORRÊA et al, 2010; LEE, et al., 2006), e que alguns flavonóides pode atuar inibindo a formação de filopodias em células de tumor (LEE, et al., 2006).

### **2.3. Abordagens terapêuticas de gliomas malignos no SNC**

O glioblastoma multiforme humano é o mais maligno entre os glioblastomas, em virtude do seu crescimento rápido, da destruição de extensas áreas de tecido nervoso e do edema intenso que provoca. O prognóstico é delicado, e a maioria dos pacientes não sobrevive um ano e meio depois de confirmado o diagnóstico. Mesmo com a grande malignidade, as metástases ocorrem apenas no SNC pela via liquórica, e metástases em outros órgãos são muito raras (NAKADA, et al., 2007; CLARKE, et al., 2010; ROWLAND, 1986; BRASILEIRO-FILHO et al., 1994; COTRAN, et al., 2000; PORTO, 2001).

Nos Estados Unidos, cerca de 51.000 tumores primários do cérebro são diagnosticados a cada ano, sendo que destes, cerca de 36% são gliomas, com metade destes sendo classificados como glioblastomas (GBM) ou, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como astrocitomas de grau IV (CLARKE, BUTOWSKI & CHANG, 2010). No Brasil, segundo dados do Sistema de Informação sobre Mortalidade, do total de óbitos do ano de 2008, cerca de 6.934 foram causados por câncer, sendo que as neoplasias malignas do SNC (meninge, encéfalo

e outras partes do SNC) corresponderam a aproximadamente 1.468 na região Nordeste e a 381 na Bahia (Brasil, 2008).

A conduta terapêutica atualmente adotada para o tratamento de glioblastomas é multidisciplinar, geralmente consistindo na combinação de cirurgia com radioterapia e quimioterapia, esta última constituída essencialmente de drogas citotóxicas, como as nitroso-uréias que são pouco ativas, com um aumento da sobrevida dos pacientes somente de alguns meses (HILDEBRAND et al., 1997). A eficácia terapêutica é limitada também como reflexo da propriedade infiltrante dos glioblastomas, o que torna uma ressecção total impossível sem que haja dano neurológico ao paciente (HILDEBRAND et al., 1997; VANDIER et al., 1998).

Recentes avanços no tratamento de glioblastomas têm sido relatados, como a combinação de radioterapia com a Temozolamida (TMZ) mais tratamento adicional com TMZ em doses mais freqüentes, após ressecção cirúrgica do tumor; e o uso da terapia com anticorpos antiangiogênicos contra o fator de crescimento do endotélio vascular-VEGF (CLARKE, BUTOWSKI & CHANG, 2010; NONES et al. 2010). Entretanto, apesar destes avanços, o tempo médio de vida dos pacientes com glioblastoma fica em torno de 14 meses, após diagnóstico (NONES et al. 2010). Novos agentes terapêuticos têm sido sugeridos, dentre eles os retinóides e citocinas (DEFER et al., 1997; VANDIER et al., 1998; CHAMBAUT-GUERIN et al., 2000; COSTA et al., 2001; CLARKE, BUTOWSKI & CHANG, 2010), mas a eficácia clínica destes agentes ainda está em discussão, fato que justifica a importância em se descobrir novas moléculas capazes de agir mais eficazmente. Neste sentido, a utilização de compostos que além de inibirem o crescimento, sejam capazes de inibir a migração e invasão através da regulação da expressão de MMPs e TIMPs e remodelagem de componentes da MEC, bem como a síntese de fatores angiogênicos necessários ao crescimento do tumor, tem sido considerada como uma das abordagens mais promissoras para o tratamento de tumores sólidos altamente invasivos, tal como glioblastomas.

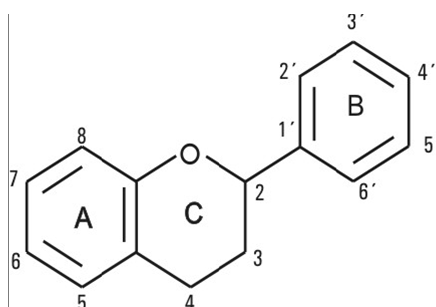
Dentre os aspectos histopatológicos de gliomas malignos, a indução de proliferação microvascular e a alta capacidade proliferativa e invasiva, têm sido alvo importantes pesquisas direcionadas na busca de compostos naturais que

apresentem efeito antiangiogênico e antiproliferativo contra células tumorais. Dentre estes compostos, têm se destacado os flavonóides (NONES, et al. 2010).

### 3. Propriedades farmacológicas de flavonóides

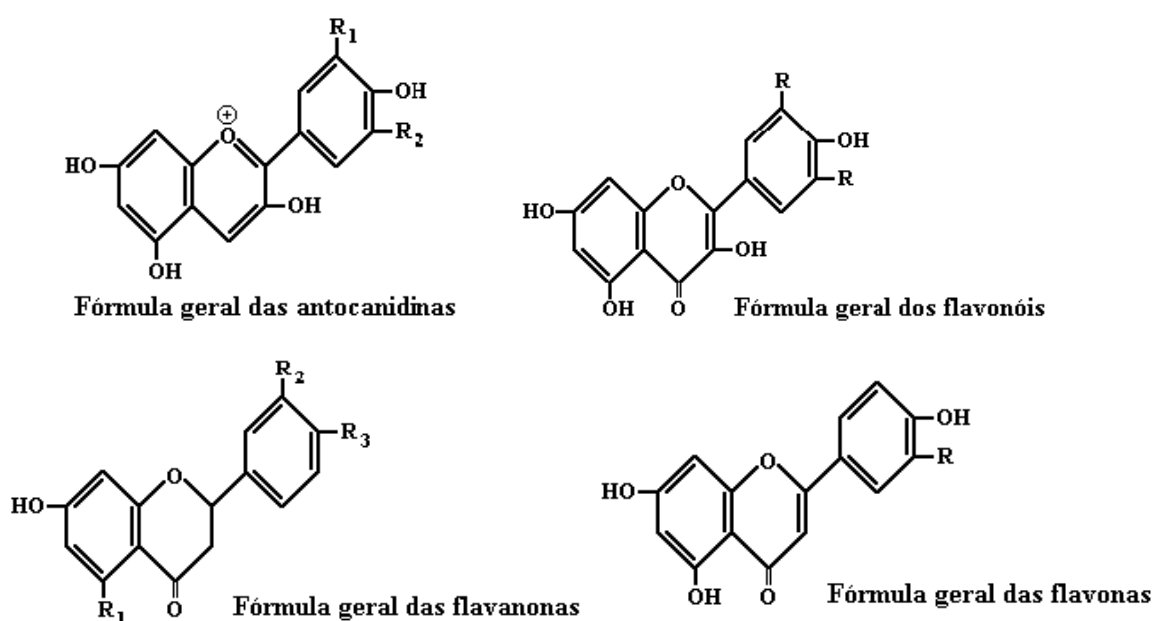
#### 3.1. Características químicas e estruturais dos flavonóides

Inúmeras drogas extraídas de plantas medicinais do Estado da Bahia fazem parte de famílias já estabelecidas convencionalmente como úteis no tratamento de infecções parasitárias, virais e processos tumorais. Estas drogas diferem no potencial toxicológico e terapêutico anticâncer e/ou antiinfecção através dos mecanismos pelos quais interferem nos processos biológicos, nas diversas fases mitóticas e na síntese protéica (VERDIER-PINARD 1999). Os flavonóides são pigmentos hidrossolúveis presentes nos vacúolos das células vegetais e que representam o maior grupo de compostos fenólicos naturais. O termo flavonóide engloba um grupo de compostos polifenólicos complexos derivados de benzo-gama-pirona, os quais são estruturalmente constituídos de 15 átomos de carbono ( $C_{15}$ ) no seu esqueleto fundamental (YOKOZAWA et al, 1997; NONES, et al., 2010) que apresentam uma estrutura comum, caracterizada por dois anéis aromáticos, conhecidos como anel A e B, e um heterociclo oxigenado ou anel C (Fig. 4). Por serem amplamente distribuídos no reino vegetal (geralmente na forma solúvel de heterosídeos, presentes em todas as angiospermas), os flavonóides fazem parte, obrigatoriamente, da dieta humana (YUNES, 2001).



**Figura 4-** Estrutura geral dos flavonóides (Adaptado de YUNES & CALIXTO, 2001).

Na família dos flavonóides, já foram descritos mais de 4.000 compostos fenólicos, os quais se subdividem em flavanóis (ex. catequina, epicatequina, epigallocatequina), flavonóis (ex. kaempferol e quercetina), flavanonas (ex. hesperetina e naringenina), flavonas (ex. rutina, apigenina e luteolina), isoflavonas (ex. daidzein e genisteína) e antocianidinas (ex. pelargonidina, cianidina e malvidina) (Fig. 5) (HARBONE, 1988; YUNES, 2001; NONES et al., 2010). Dentro de cada grupo, podem ocorrer diferenças individuais resultantes de variações no número e posição dos grupamentos hidroxilas, por modificações nos núcleos (especialmente, o pirônico), e pelo grau de metilação e glicosilação, os quais afetam várias propriedades dos flavonóides, particularmente a hidrofobicidade das moléculas (YUNES, 2001).



**Figura 5-** Estrutura das principais classes de compostos polifenólicos (Adaptado de YUNES & CALIXTO, 2001).

Tais compostos apresentam diversas funções biológicas nos vegetais, a exemplo do bloqueio da radiação ultravioleta extrema e destrutiva para ácidos nucléicos e proteínas, e da permissão da passagem seletiva de luz no comprimento de onda do verde-azulado ao vermelho, que são importantes para a fotossíntese, dentre outras. Os flavonóides atuam ainda na comunicação com o ambiente externo, servindo como sinalizadores visuais nas flores, para a atração de animais polinizadores e afetam as interações simbióticas entre as plantas e bactérias fixadoras de nitrogênio, podendo também participar na regulação do crescimento do vegetal (YUNES et al., 2001; RAVEN et al., 2001; LOPES et al., 2003).

### **3.2. Propriedades biológicas dos flavonóides em vertebrados**

O interesse pelos flavonóides tem aumentado à medida que suas atividades biológicas vão sendo descobertas. Trabalhos têm demonstrado que estas moléculas apresentam ação antibacteriana, antiviral, antiinflamatória, antialérgica, antitumoral e vasodilatadora, entre outras (YUNES, 2001; RAVEN et al., 2001; JANBAZ et al., 2002). Flavonóides contidos em vinhos tintos, dentre eles a quercetina, têm sido associados à saúde cardiovascular devido, provavelmente, ao seu efeito antioxidativo. Patologistas apóiam esta afirmativa por observarem, em dissecações, as boas condições das paredes vasculares (homogêneas e livres de aterosclerose) de indivíduos que consumiram regularmente esta bebida (HAVSTEEN, 2002). Lopes et al. (2003) demonstraram a ação do flavonóide naringenina e do chitosan na redução dos níveis de colesterol e de triacilgliceróis em coelhos com hiperlipidemia induzida por triton, além do aumento dos valores de colesterol HDL. Muitos destes efeitos conhecidos dos flavonóides tem sido rassociados a sua propriedade antioxidante, incluindo os mecanismos de supressão da formação de espécies reativas de oxigênio (WILLIAMS, SPENCER, RICE-EVANS, 2004). A atividade antimutagênica de flavonóides também vem sendo investigada e já se detectou que flavonóides têm a capacidade de regular a proliferação celular, fenômeno diretamente implicado na formação do câncer. Diante da diversidade de efeitos atribuídos a flavonóides de diferentes classes, muitos pesquisadores buscam esclarecer possíveis relações entre estrutura e função visando à elucidação do



potencial terapêutico, e o desenvolvimento de novos fármacos (LAZARO-LOPEZ, 2002).

Segundo Havsteen (2002), flavonóides podem estimular tanto a resposta imune humoral quanto a celular. Embora não se conheça muito sobre como eles agem, sabe-se que são capazes de estimular a produção de anticorpos, talvez por meio da produção de citocinas, e, como inibem a síntese de prostaglandinas (PGs), conhecidamente supressoras de células T, os flavonóides apresentam atividade também sobre a imunidade celular. Há também registros de reações alérgicas em 3-5% da população após ingestão de produtos ricos em flavonóides. Os flavonóides alertam o sistema imune, fortalecendo a defesa contra agentes infecciosos, podendo, ainda, inibir ou estimular a atividade e/ou a produção de citocinas como IL-5 e INFs, contudo parece que o seu principal efeito é o de alertar os macrófagos, nos quais penetram, possivelmente, ao se ligarem a proteínas e sofrerem processo de endocitose, próprio dessas células (HAVSTEEN, 2002).

### **3.3. Efeitos dos flavonóides no sistema nervoso central (SNC)**

No sistema nervoso central (SNC), o mecanismo pelo qual os flavonóides podem exercer suas funções ainda não está muito claro. Entretanto, estudos têm demonstrado algumas influências de flavonóides sobre o SNC: o flavonóide quercetina atua como agonista de receptores de adenosina no cérebro de humanos (BLARDI et al, 1999); derivados sintéticos de flavonas se ligam a receptores benzodiazepínicos (VIOLA et al., 2000). Mercer et al (2005) demonstraram que polifenóis naturais apresentam potente ação neuroprotetora para neurônios dopaminérgicos em cultura. Algumas evidências da ação neuroprotetora de flavonóides conhecidas são a modulação de cascatas de sinalização intracelular envolvidos no controle da sobrevivência, morte e diferenciação; efeitos na expressão de genes e efeitos mitocondriais (SPENCER, RICE-EVANS & WILLIAMS, 2003; GALLI, SHUKITT-HALE & YODIM, 2002).

Recentemente, o efeito neuroprotetor do flavonóide casticina, extraído da *Croton betullaster* (planta encontrada no estado da Bahia-Brasil), foi investigado em

cultura de neurônios do córtex cerebral de rato. Foi observado que a casticina aumentava a população celular marcada para  $\beta$ III-tubulina e para o fator de transcrição neuronal Tbr2 (SPOHR et al., 2010). Além disso, foi observado que os astrócitos eram mediadores ativos dos efeitos da casticina, pois em cultura de células progenitoras neuronais com monocamadas de astrócitos previamente tratados com casticina, houve indução de um aumento de cerca de 40% da população neuronal. Este evento foi mediado pela secreção de fatores neuroprotetores solúveis, pelos astrócitos que protegeu os progenitores neuronais da morte celular por apoptose (SPOHR et al., 2009; NONES, et al., 2010). Outras observações importantes a respeito dos efeitos da rutina sobre células gliais foram a regulação promovida dos níveis do neuromediador NO e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , liberados no meio de culturas primárias de astrócitos e microglia (SILVA et al., 2008).

A ação antitumoral dos flavonóides, principalmente nos tumores cerebrais, tem sido relatada em muitos trabalhos. Entretanto, ainda é muito pouco o conhecimento acerca das propriedades antitumorais de flavonóides contra gliomas (NONES et al., 2010). Scheck et al., (2006), mostraram que flavonóides provenientes de extrato da *Scutellaria baicalensis* inibiram a viabilidade, o crescimento e induziram apoptose em células de glioblastoma humano. Ferguson et al., (2006) também mostraram que flavonóides presentes em *Vaccinia macrocarpa* induzia a inibição de proliferação, crescimento e apoptose em células de glioblastoma da linhagem U87. Além disso, o flavonóide quercetina demonstrou inibir a proliferação celular, a viabilidade e induziu apoptose em células de glioblastoma U138MG. Sharma, et al., (2007), observaram que o flavonóide kaempferol induzia apoptose em glioblastoma da linhagem LN229, U87MG e T98G, e potencializava o efeito citotóxico do agente quimioterapêutico doxorrubicina, pelo elevado estresse oxidativo (SCHECK, PERRY & HANK, 2006; FERGUSON, KUROWSKA, FREEMAN et al., 2006; BRAGANHOL et al., 2006; SHARMA, JOSEPH & GHOSH, 2007; SON YG, KIM & KIM, 2007). Estudos também apontam a ação do flavonóide rutina, extraído da *Dimorphandra mollis*, e dos flavonóides acacetina, casticina, apigenina e pendulitina, extraídos de *Croton betulaster*, e o biflavonóide agatisflavona, extraído de *Caesalpynia pyramidalis*, sobre células de glioblastoma multiforme humano da

linhagem GL15, alterando o crescimento e inibindo a secreção de fatores pro-angiogênicos VEGF e TGF- $\beta$  (SOUZA et al., 2009; FREITAS, et al., 2010).

Todos estes achados recentes, sobre a ação de flavonóides em células do SNC normais e transformadas, mostram o potencial destes compostos na morfogênese, na inibição do crescimento, e alteração da fisiologia destas células. Eles destacam a importância de desenvolver estudos sobre efeitos e mecanismos de ação de flavonóides para esclarecimentos e aplicações no âmbito das patologias do SNC como gliomas malignos, e outras doenças neurodegenerativas.

## OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetiva investigar propriedades antitumorais de flavonóides extraídos de plantas das famílias *Dimorphandra mollis*, *Croton betulaster* e *Caesalpinia pyramidalis*, avaliando o potencial anti-proliferativo, anti-invasivo e morfogênico dos flavonóides sobre células de glioblastoma humano altamente proliferativo da linhagem GL-15.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### Capítulo 1

1. Investigar os efeitos do flavonóide rutina sobre o crescimento celular, viabilidade celular e modificações fenotípicas de células da linhagem GL-15.

#### Capítulo 2

2. Investigar os efeitos dos flavonóides polihidroxilados 5,7-dihidroxi-flavona; 3',4'-dihidroxi-flavona, 4',5,7-trihidroxi-flavona, 3,4',5,7-tetrahidroxi-flavona (ou kaempferol), 3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona (ou quercetina), e 3-O-rutinosídeo de 3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona (ou rutina) na viabilidade celular, modificação fenotípica e na capacidade invasiva e migratória em cultura de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15.

## **CAPÍTULO 1: ANTIPROLIFERATIVE, PROAPOPTOTIC AND MORPHOGENIC EFFECTS OF THE FLAVONOID RUTIN ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS.**

### **[EFEITOS ANTIPROLIFERATIVO, PRO-APOPTÓTICO E MORFOGÊNICO DO FLAVONÓIDE RUTINA EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA HUMANO]**

B. L. Santos, A.R. Silva, S.R. Freitas, B.P.S., Pitanga, C.S. Sousa, M.S. Grangeiro, B.O., Fragomeni, P.L.C. Coelho, R.A. Barreto, M.F.D. Costa, R.S. El-Bachá, E.S. Velozo, G.P. Sampaio, S.M. Freire, M. Tardy, S.L.Costa

**Food Chemistry 127(2): 404-411. [doi:10.1016/j.foodchem.2010.12.131](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.131)**

**[RESUMO.** Neste estudo, nós investigamos o efeito do flavonóide rutina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona-3-rutinosídeo) em células de glioma, usando uma linhagem celular derivada de glioblastoma multiforme humano altamente proliferativa (GL-15) como modelo experimental. Nós observamos que rutina (50-100  $\mu\text{M}$ ) reduziu a proliferação e a viabilidade de células GL-15, bem como os níveis de expressão de ERK1/2 fosforilada (P-ERK 1/2), e acúmulo das células na fase G2 do ciclo celular. Por outro lado, 87,4% das células GL-15 expostas a 100  $\mu\text{M}$  de rutina entraram em apoptose, como revelado pela citometria de fluxo, após marcação com Anexina V/PI. Condensação nuclear e a fragmentação de DNA também foram observados, confirmando a ocorrência de apoptose. Além disso, as células remanescentes tratadas com 50  $\mu\text{M}$  de rutina apresentaram um padrão morfológico de diferenciação astrogliar em cultura, caracterizada pela presença de um corpo celular condensado e finos processos com expressão elevada de GFAP. Devido a sua capacidade de induzir diferenciação e apoptose em cultura de células de glioblastoma humano, a rutina pode ser considerada um candidato em potencial para o tratamento de gliomas malignos.]

## **ANTIPROLIFERATIVE, PROAPOPTOTIC AND MORPHOGENIC EFFECTS OF THE FLAVONOID RUTIN ON HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS.**

B. L. Santos<sup>1</sup>, A.R. Silva<sup>1</sup>, B.P.S., Pitanga<sup>1</sup>, C.S. Sousa<sup>1</sup>, M.S. Grangeiro<sup>1</sup>, B.O., Fragomeni<sup>1</sup>, P.L.C. Coelho<sup>1</sup>, M.N. Oliveira<sup>1</sup>, N.J. Menezes-Filho<sup>1</sup>, M.F.D. Costa<sup>1</sup>, R.S. El-Bachá<sup>1</sup>, E.S. Velozo<sup>2</sup>, G.P. Sampaio<sup>3</sup>, S.M. Freire<sup>3</sup>, M. Tardy<sup>4</sup>, S.L.Costa<sup>1\*</sup>

1. Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Reitor Miguel Calmon s/º, Vale do Canela 40110-100, Salvador-BA, Brazil;

2. Laboratório de Química Médica e Produtos Naturais, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Rua Barão de Jeremoabo, s/nº - Campus Universitário de Ondina, 40170-115 Salvador-BA, Brazil;

3. Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Reitor Miguel Calmon s/º, Vale do Canela 40110-100, Salvador-BA, Brazil;

4. Université PARIS XII Val-de-Marne, 61 Avenue du Général de Gaulle 94010 Créteil Cedex, France.

\*Corresponding Author: Prof. Dr. Silvia Lima Costa, Laboratório de Neuroquímica e Biologia Celular, Departamento de Biofunção/Bioquímica, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Av. Reitor Miguel Calmon s/nº, Salvador, BA, 40.110-100, Brazil, Tel: (55) 71 3283 8919, Fax: (55) 71 3283 8927. [costasl@ufba.br](mailto:costasl@ufba.br)

## ABSTRACT

In this study, we investigated the effects of the flavonoid rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside) on glioma cells, using the highly proliferative human cell line GL-15 as a model. We observed that rutin (50-100  $\mu\text{M}$ ) reduced proliferation and viability of GL-15 cells, leading to decreased levels of ERK1/2 phosphorylation (P-ERK1/2) and accumulation of cells in the G2 phase of the cell cycle. On the other hand, 87.4% of GL-15 cells exposed to 100  $\mu\text{M}$  rutin entered apoptosis, as revealed by flow cytometry after AnnexinV/PI staining. Nuclear condensation and DNA fragmentation were also observed, further confirming that apoptosis had occurred. Moreover, the remaining cells that were treated with 50  $\mu\text{M}$  rutin presented a morphological pattern of astroglial differentiation in culture, characterized by a condensed cell body and thin processes with overexpression of GFAP. Because of its capacity to induce differentiation and apoptosis in cultured human glioblastoma cells, rutin could be considered as a potential candidate for malignant gliomas treatment.

**Key words:** rutin, flavonoid, gliomas, apoptosis, differentiation, P-ERK, GFAP

## 1. Introduction

Glioblastomas are very invasive and proliferative tumours that occur in cerebral hemispheres (Louis et al., 2007). The current treatment for this type of cancer consists of surgical resection followed by radiotherapy and/or chemotherapy, providing patients with a median survival of less than one year (Brandes, Pasetto, & Monfardini, 2000). New compounds such as tamoxifen and retinoids have been tested as alternative drugs, but pre-clinical treatments remain inconclusive (Costa et al., 2001). Therefore, new compounds with antitumor potential are needed as an alternative to the classical cytotoxic treatments.

Plants are a good source of putative antitumour drugs, and a large number of plant-derived compounds are being tested for antineoplastic activity. *Dimorphandra mollis* Bent (Caesalpinoideae) is a perennial shrub indigenous to Brazil that has been traditionally used to treat a wide range of pathologies, such as ulcerative lesions of skin or diarrhoea and haemorrhages (Robbers, Tyler & Speedie, 1997). This plant is a robust source of rutin (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone-3-rutinoside), a well-known flavonoid that has been extensively studied and possesses various pharmacological properties. Among the pharmacological properties attributed to flavonoids isolated from various medicinal plants around the world, an antitumour activity of flavonoids against mammary cancer has been described (Lamartiniere et al., 2002; Fresco, Borges, Diniz, & Marques, 2006; Ramos, 2007). Rutin and its aglycone quercetin form have been shown to have chemopreventive activity in both a variety of colonic cancer cell lines and in animal models (Deschner, Ruperto, Wong & Newmark, 1991; Lipkin, 1999; Yang et al., 2000). Fernandez and colleagues (2006) have reported a depressant action for rutin and others available flavonoid glycosides on the central nervous system (CNS), suggesting that these molecules cross the blood-brain barrier. However, little is known about any neurotoxic and antitumour activities in the CNS. An inhibitory effect was demonstrated in rat C6 and human U138MG glioma cell lines treated with the aglycone quercetin (Chen, Jeng, Lin, Wu & Chen, 2006; Braganhol et al., 2006). Moreover, we recently observed that rutin affects astrocytes and microglial cells in primary culture, inducing them to secrete neurotrophic factors such as NO and TNF $\alpha$  (Silva et al., 2008). Understanding the role of such natural molecules on the growth and viability of human glioma cells may help to elucidate the



antitumour activity of these drugs and generate new potential candidates for glioma treatment. In this study, we investigated the effects of rutin on the highly proliferative human glioblastoma cell line GL-15 (Bocchini, Casalone, Collini, Rebel & Lo Curto, 1991) with regards to cell growth, viability and phenotypic modification.

## **2. Methods**

### **2.1. Cell line and culture**

GL-15 (Bocchini, Casalone, Collini, Rebel & Lo Curto, 1991) stock cultures (passages 83-105) were maintained in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub> at 37°C in medium consisting of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% foetal bovine serum (GIBCO BRL, Grand Island, NY), a nutrient mixture (7 mM glucose, 2 mM glutamine, 0.011 g/l pyruvate) and antibiotics (100 IU/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin). Cells were grown in 100 mm diameter tissue culture plates (TTP, Switzerland) containing 10 ml medium, which was replaced three times per week. Stock cultures were subcultured into new plates every 3-4 days and cultures for experiments were seeded into polystyrene culture plates as needed. After 24 h the culture medium was changed and the various analytical procedures were performed on cultures.

### **2.2. Flavonoid and treatment**

The flavonoid rutin was extracted from *Dimorphandra mollis* seeds by recrystallisation in tetrahydrofuran (THF), according to the Merck S.A. procedures in LAPEMM-FFar-UFBA. The methanol extract obtained from broadbeans of *Dimorphandra mollis* was fractionated into n-BuOH and aqueous layers through solvent fractionation. Repeated silica gel column chromatography of the n-BuOH layer and recrystallisation from THF produced the flavonol glycoside rutin (99% purity). For experiments it was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, St Louis, MO) at a concentration of 20 mM and stored in the dark at -20°C. When applied to cells, rutin was dissolved in the medium at final concentrations of 1, 10, 50 and 100 µM and incubated for 24-72 hours. Control cells were treated with the same volume of DMSO that was used as a vehicle for rutin. DMSO (0.5%) did not show

any significant effect on the analysed parameters when compared to cultures that were not exposed to this solvent.

### **2.3. Cell viability and proliferation**

#### **LDH activity**

Membrane integrity was evaluated by measuring lactate dehydrogenase (LDH) activity in culture medium from control and treated cells, and evaluated as an index of cell death. Cells were grown in 40 mm diameter plates ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate) treated with 1-100  $\mu\text{M}$  rutin or 0.5% DMSO (control) for 24-72 h. The culture medium was then removed and LDH activity (IU/l) was measured according to the manufacturer's protocol (Doles, Goiás, Brazil). Three independent experiments were carried out for each experimental point. Experimental results were expressed in terms of LDH activity (IU/ml of culture medium) in at least three replicate experiments.

#### **Trypan blue staining**

Growth curves and membrane integrity were obtained after Trypan blue staining of control or treated cells seeded on 40 mm polystyrene culture dishes ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate). Both adherent and floating cells were obtained after trypsinisation and were centrifuged for 10 minutes at  $1,300 \times g$ . Cells were then suspended in 200  $\mu\text{l}$  DMEM without supplements and stained with Trypan blue at a final concentration of 0.1% (v/v). Three replicate experiments were performed for each analysis; the number of viable and non-viable cells/ $\mu\text{l}$  was determined after 24-72 h exposure to rutin (1 – 100  $\mu\text{M}$ ) by counting four 10  $\mu\text{l}$  samples of cell suspension for each experiment in a Burker chamber (Boehringer Mannheim).

#### **Thymidine incorporation**

The effect of rutin on cellular proliferation was studied by measuring 2-(methyl- $^3\text{H}$ ) thymidine incorporation (1  $\mu\text{Ci/ml}$ , Amersham). In brief, cells were cultured in 96 well plates (TPP Switzerland;  $1 \times 10^4$  cells/well) and incubated in four replicates with 1 – 100  $\mu\text{M}$  rutin, or 0.5% DMSO (control) for 24 and 72 h. Cells were pulse-labelled for the final 5 h by adding 1  $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$  of [ $^3\text{H}$ ]-thymidine to the culture medium. After this incubation, cells were collected in a glass fibre filter (Packard) using a cell harvester (Filtermate 196, Packard, Meriden, CT, USA) and allowed to dry for 24 h.

Incorporation of radioactive thymidine was determined by gas scintillation in a direct beta counter (Packard). Cell counts were performed for four independent experiments and results (mean  $\pm$  S.D.) were expressed as percentage of control incorporation (considered as 100%).

### **Flow Cytometry**

Flow cytometry analysis of DNA content was performed to assess the cell cycle phase distribution after rutin (50  $\mu$ M) was added to logarithmically growing GL-15 cells. After exposure, GL-15 cells were harvested by trypsinisation, fixed with cold ethanol and stained with propidium iodide (Biosource, Camarillo, CA). Flow cytometry was performed on a BD FACS Calibur. The software BD Cell Quest<sup>™</sup> Pro was used to generate histograms and determine the cell cycle phase distribution. Experiments were performed at least three times.

### **Western blot analysis for MAPK signalling**

To investigate the regulation of MAPK signalling by rutin in glioblastoma cells, we determined the expression of phosphorylated and unphosphorylated forms of ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa). Total protein content was determined in control or treated cells seeded in 40 mm polystyrene culture dishes ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate). After 24-72 h exposure, cells were rinsed twice with PBS, lysed and harvested in a 2% (w/v) SDS, 2 mM EGTA, 4 M urea, 0.5% (v/v) Triton X-100, 62.5 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) supplemented with 1  $\mu$ l/ml protease inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO). Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) using a protein assay reagent kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Twenty micrograms of total protein extract were loaded onto a discontinuous 4% stacking and 12% running SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Electrophoresis was performed at 200 V for 45 min. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA). Equal protein loading was confirmed by staining membranes with Ponceau Red (Sigma). Membranes were then blocked for 1 h at room temperature in 20 mM TBS (pH 7.5) containing 0.05% Tween 20 (TBS-T) and 5% powdered skim milk. Subsequently, membranes were incubated with rabbit anti-ERK1/2 (1:1000, Santa Cruz) or mouse anti-phospho-MAP kinase 42/44 (1:1000, Santa Cruz) diluted in TBS-T containing 1% powdered skim milk for 1 h. Conjugated alkaline phosphatase goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1:5,000 in TBS-T, Bio-Rad, Hercules, CA) was used as a

secondary antibody. Immunoreactive bands were visualised using an AP-conjugated substrate kit (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Quantification was performed by scanning densitometry (ScanJet 4C – HP) of three independent experiments and analysed with ImageJ 1.33u (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Antibody specificity and linearity of the densitometric analysis system was assessed by serial dilutions of total protein from cells in control conditions within a range of 5-20  $\mu\text{g}$  of protein per lane.

## **2.4. Morphological changes and differentiation**

### **Rosenfeld's staining and immunocytochemistry**

Morphological changes were primarily assessed by analysing Rosenfeld's staining. All control and treated cells seeded on 40 mm polystyrene culture dishes ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate) were rinsed three times with PBS (without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ ) and fixed for 10 min with methanol at  $-20^\circ\text{C}$ . Fixed cells were stained with Rosenfeld's reagent (1 ml) for 20 min at room temperature. Plates were then rinsed with water, air-dried, analysed in an optic phase microscope (Nikon TS-100) and photographed using a digital camera (Nikon E-4300).

Morphological changes and astroglial differentiation were also studied by immunocytochemistry for the cytoskeletal proteins vimentin, a marker of immature glial cells, and GFAP (glial fibrillary acidic protein), an astrocyte marker. All control and treated cells seeded on 40 mm polystyrene culture plates ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate) were rinsed three times with PBS and fixed with cold methanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 10 minutes. Non-specific binding of antibody reagents was blocked by preincubating the plates with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Cells were incubated with mouse monoclonal antibodies against anti-vimentin (clone 3B4, 1/250, Biomakor, Israel) or rabbit polyclonal antibodies specific for GFAP (1/250, DAKO, Denmark) diluted in PBS, for 12 h at  $4^\circ\text{C}$  under slow agitation. After three washes with PBS, cells were incubated with rhodamine-conjugated antibodies specific for mouse or rabbit IgG (1/500, Boehringer Mannheim) diluted in PBS, for 2 h at room temperature. Thereafter, cells were analysed using an epifluorescence microscope (Olympus BX-2) and photographed. Ten randomised fields were analysed.

### **Protein assay and western blotting**

GFAP and vimentin expression was also investigated by western immunoblotting. Total protein content was determined in control or treated cells seeded on 40 mm polystyrene culture dishes ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate). After 24-72 h exposure, cells were rinsed twice with PBS, lysed and harvested in a 2% (w/v) SDS, 2 mM EGTA, 4 M urea, 0.5% (v/v) Triton X-100, 62.5 mM Tris-HCl buffer (pH 6.8) supplemented with 1  $\mu$ l/ml protease inhibitor cocktail (Sigma, St Louis, MO). Protein content was determined by the method of Lowry et al. (1951) using a protein assay reagent kit (Bio-Rad, Hercules, CA). For western immunoblot analysis, 20  $\mu$ g protein was loaded onto a discontinuous 4% stacking and 12% running SDS polyacrylamide gel (SDS-PAGE). Electrophoresis was performed at 200 V for 45 min. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Equal protein loading was confirmed by staining membranes with Ponceau Red (Sigma). Thereafter, membranes were blocked for 1 h at room temperature in 20 mM TBS (pH 7.5) containing 0.05% Tween 20 (TBS-T) and 5% powdered skim milk. Subsequently, membranes were incubated with rabbit anti-GFAP (1:1,000, SIGNET, Dedham, MA) or mouse anti-vimentin (1:1,000, clone 3B4, OXFORD Biotechnology, Oxford, United Kingdom) monoclonal antibody diluted in TBS-T containing 1% powdered skim milk for 1 h. Conjugated alkaline phosphatase goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG (1:5,000 in TBS-T, Bio-Rad, Hercules, CA) was used as a secondary antibody. Immunoreactive bands were visualised using AP-conjugated substrate Kit (Bio-Rad, Hercules, CA) according to the manufacturer's instructions. Quantification was obtained by scanning densitometry (ScanJet 4C – HP) of three independent experiments and analysed with ImageJ 1.33u. Antibody specificity and linearity of the densitometric analysis system was assessed by serial dilutions of total protein from cells in control conditions within a range of 5-20  $\mu$ g of protein per lane.

## **2.5. Apoptosis detection**

The present study was designed to investigate whether rutin exerts antiproliferative effects on glioblastoma cells by inducing apoptosis or necrosis. Thus, the 100  $\mu$ M higher concentration of rutin was tested.

## **Annexin V analysis**

Apoptosis was detected by monitoring phosphatidylserine externalisation using an Annexin V-FITC/Propidium iodide staining kit (US-BD Biosciences Clontech). Untreated and treated cells were cultured for 24 h in 40 mm diameter plates ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate). Approximately  $1.5 \times 10^4$  cells were then resuspended in 100  $\mu$ l of binding buffer containing Annexin V-FITC (0.125  $\mu$ g/ml), propidium iodide (5  $\mu$ g/ml), ddH<sub>2</sub>O and annexin buffer, following the kit recommendations. After 15 min incubation at room temperature in the dark, cells were analysed by flow cytometry using a FACSort BD machine (US-BD Biosciences Clontech). At least 10,000 events were recorded, and annexin-V-positive cells (apoptotic) and propidium iodide-positive cells (necrotic) were presented as percentages of labelled cells related to the total number of cells counted.

### **Chromatin staining**

Apoptosis of GL-15 cells was also determined by Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) staining, which allows us to detect and quantify cells with fragmented and condensed chromatin. After washing with PBS, cells cultured on 40 mm plates ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate) were fixed for 10 min with methanol at  $-20^\circ\text{C}$  for 20 minutes. Subsequently, fixed cells were stained with Hoechst 33258 at a final concentration of 5  $\mu$ g/ml in PBS, for 10 minutes at room temperature in a dark chamber. Thereafter, the cells were washed with PBS and the plates were analysed by fluorescence microscopy (Olympus AX70) and photographed. The apoptotic index represents the percentage of fragmented nuclei and was determined in a microscopic field of at least 500-cells/experimental point.

### **Single cell electrophoresis assay of DNA**

DNA integrity and single-strand breaks were monitored using single cell gel electrophoresis (comet assay) performed under alkaline conditions, essentially following the procedure described by Ribeiro (2006) with some modifications. Briefly, all control and treated cells seeded on 40 mm polystyrene culture dishes ( $1.5 \times 10^5$  cells/plate) were incubated for 24 or 72 h in the presence of rutin, using 0.5% DMSO as a negative control or 1 h direct exposure to UV light as a positive control. After treatment the cells were scraped at  $4^\circ\text{C}$  and centrifuged at  $1,000 \times g$  for 10 minutes. The pellet was diluted in 150  $\mu$ L of PBS, and 30  $\mu$ L of cell suspension was mixed with 300  $\mu$ l of 1% (w/v) low-melting-point agarose (Sigma-Aldrich), and applied on the

surface of a normal-melting-point agarose-precoated slide to form a microgel and allowed to set at  $-20^{\circ}\text{C}$  for 5 min. Microgels were submersed in cell lysis buffer (14.61% NaCl, 3.72% EDTA, 0.12% Tris pH 10, 1% Triton X-100 and 10% DMSO) for 1 h at  $4^{\circ}\text{C}$  with protection from light. Following cell lysis, slides were washed with PBS for 10 minutes to remove salt and detergent from the microgel. Slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and were allowed to equilibrate for 20 minutes with electrophoresis buffer (0.034% EDTA, 0.3 N NaOH, pH 13). Electrophoresis was performed at 0.13 A and 25 V for 25 minutes. Slides were rinsed with neutralisation solution (12.12 % Tris HCl, pH 7.5) three times for 5 minutes each, fixed with 100% ethanol, air-dried and stored protected from light until analysis. For analysis and scoring, DNA comet slides were stained with 0.1% ethidium bromide (25  $\mu\text{l}$ ) for 5 min and coverslips were applied before image analysis. Comet assay samples were analysed at 200 $\times$  magnification using an epifluorescence microscope (Olympus BX-2) with a rhodamine filter. Three replicate experiments were performed with two slides per experiment and UV irradiation point. The electrophoresed DNA appears as a comet, with undamaged DNA in the head and fragmented DNA migrating to form a tail. Comet images were recorded using a Variocam digital camera (PCO, Germany). Two hundred randomly selected cells were scored from each slide (two slides per dose), and the percentage of comet cell (comet rate) was calculated.

## **2.6. Statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. One-way ANOVA followed by the Student-Newmann-Keuls test was used to determine the statistical differences among groups differing in only one parameter. Student's *t* test was used to compare two groups. Values of  $P < 0.05$  were considered significant.

## **3. Results**

### **Cell viability and growth**

The effect of rutin on the proliferation of GL-15 human glioblastoma cells over a 72 h period was investigated using both trypan blue staining and thymidine incorporation

assays (Fig. 1A, B). Growth curves of viable cells obtained from the trypan blue staining showed that the number of viable GL-15 cells/ $\mu\text{l}$  was not changed significantly after 24 h exposure to 1-10  $\mu\text{M}$  rutin. However, treatment with 50-100  $\mu\text{M}$  rutin for 24 h reduced significantly ( $p < 0.05$ ) the number of viable cells (data not shown). After 72 h exposure, growth inhibition was more significant and was also observed in the presence of the lowest rutin concentrations used (1 and 10  $\mu\text{M}$ ; Fig. 1A). A significant ( $P < 0.05$ ) growth inhibitory effect of rutin on GL-15 cells was also evidenced by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation. When compared to cells in control conditions (0.5% DMSO), the level of  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation by GL-15 cells exposed to 10  $\mu\text{M}$  rutin was  $72.01 \pm 8.36\%$  and  $39.72 \pm 6.73\%$  after 24 h and 72 h exposure, respectively (Fig. 1B). On the other hand, rutin had a stronger inhibitory effect on growth of GL-15 cells when used at higher concentrations. A single application of 50  $\mu\text{M}$  rutin caused a reduction in  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation, namely to  $12.90 \pm 3.88\%$  after 24 h and  $26.65 \pm 4.53\%$  after 72 h exposure. At the highest rutin concentration (100  $\mu\text{M}$ ) growth inhibition of around 90% was achieved and  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation was only of  $7.82 \pm 2.24\%$  and  $10.26 \pm 1.74\%$  after 24 h and 72 h exposure, respectively.

Because rutin displayed an inhibitory effect on GL-15 cell growth, we analysed the cell cycle distribution after treatment by flow cytometry. In control conditions, the proportion of GL-15 cells in the G1 phase increased with time with a concomitant decrease in S phase (Fig. 1C). Thus, rutin induced changes in the cell cycle distribution. However, after 48 h exposure to 50  $\mu\text{M}$  rutin, cells accumulated in the G2 phase.

ERK1 (44 kDa) and ERK2 (42 kDa) are members of the MAPK family that are induced in response to growth stimuli. We therefore investigated if growth inhibition by rutin is correlated with ERK1/2 expression and phosphorylation. Figure 1D shows expression of ERK proteins (p44/p42) in GL-15 cells by western blot analysis, under control conditions (0.5% DMSO) and after 24 h exposure to rutin. We observed that ERK1/2 phosphorylation (P-ERK1/2) levels markedly decreased with 10-100  $\mu\text{M}$  rutin. However, there were no apparent changes in total ERK1/2 levels after rutin exposure.



### **Modulation of GL-15 cell morphology and expression of vimentin and GFAP**

A morphogenic effect for rutin was investigated by phase microscopy and immunocytochemistry for the intermediary filament proteins vimentin, a marker of immature glial cells, and GFAP, an astrocyte marker. In control conditions (0.5% DMSO), as revealed by phase microscopy after 72 h treatment (Fig. 2A), GL-15 cells present a bipolar fibroblast-like phenotype with cell size varying to some extent depending on the culture density. Following treatment with rutin, GL-15 cells became very elongated and some cells exhibited cytoplasm retraction with thin cellular processes. The effect was more pronounced and appeared as early as 24 h after treatment with the highest inhibitory concentrations of rutin (50-100  $\mu$ M).

Vimentin and GFAP immunolabelling, performed after a 72 h experiment, showed that confluent control GL-15 cells have a bipolar shape with a uniformly high pattern of vimentin expression but heterogeneous GFAP expression (Fig. 2A), restricted to a subpopulation of cells. After 72 h treatment with 10  $\mu$ M (data not shown), and more extensively with 50  $\mu$ M rutin, GL-15 cells displayed a more condensed cell body with a radial-like bipolar phenotype. Cells contained long thin processes expressing vimentin and GFAP, and a significant proportion (> 50%) of cells have higher levels of GFAP expression. After exposure to 100  $\mu$ M rutin, the majority of remaining cells displayed a strong retraction of their cell body and some cells had thin cellular processes expressing both vimentin and GFAP. Figure 2B shows the quantification of vimentin and GFAP-positive cells in control and in rutin treated glioma cells.

Vimentin and GFAP expression in GL-15 cells was also examined by western blotting, and the effect of rutin was investigated. Western blot analysis showed that control GL-15 cells express more vimentin than GFAP (Fig. 2C). However, after 72 h treatment GFAP protein increased in protein extracts of GL-15 cells exposed to 10  $\mu$ M of rutin, and remained higher than controls at 50  $\mu$ M rutin. However, GFAP steady-state level decreased to less than control levels in cells exposed to 100  $\mu$ M rutin. Under the same conditions, vimentin steady-state levels remained unchanged when rutin was present at 10-50  $\mu$ M, but were elevated in cells treated with 100  $\mu$ M rutin.

## Induction of apoptosis in glioblastoma cells

We investigated whether rutin induces apoptosis or necrosis on glioblastoma cells, using Annexin V-FITC/Propidium iodine staining at the optimal inhibitory concentration. Figure 3 shows an increase in apoptosis of GL-15 cells after 24 h of treatment with 100  $\mu$ M rutin. The proportion of Annexin V-positive GL-15 cells exposed to 100  $\mu$ M rutin was of 87.4%, compared with the control (0.5% DMSO) that displayed 1.6% labelled cells. Rutin at this concentration did not modify the percentage of necrosis for GL-15 cells when compared with control. Moreover, nuclear condensation and fragmentation were observed in  $40.1 \pm 4.3$  % of GL-15 cells by Hoechst staining after 72 h exposure to 100  $\mu$ M rutin (Fig. 4A). We also investigated the capacity of rutin to induce DNA strand breaks using a single cell electrophoresis assay (comet test; Fig. 4B). After 24 h of treatment, as expected, the comet rate in positive controls (UV irradiation) was  $66.01 \pm 7.45$ %. The comet rate in negative controls (0.5% DMSO) was  $6.01 \pm 0.88$ %, which increased to  $16.21 \pm 1.99$ % in cells exposed to 100  $\mu$ M rutin. After 72 h, the comet rate in the negative control was  $19.72 \pm 1.98$ %, which increased to  $44.21 \pm 5.90$ % in cells exposed to 100  $\mu$ M rutin and  $97.5 \pm 9.0$ % when cells were exposed to UV irradiation.

## 4. Discussion

In this study, we investigated the antitumour potential of rutin, which had been extracted from seeds of the Brazilian plant *Dimorphandra mollis*, in terms of growth inhibition, viability and differentiation of cultured human glioma cells. The highly proliferative human glioblastoma cell line GL-15 established by Bocchini et al., (1991) was used as a model.

The effect of rutin on the proliferation of GL-15 glioma cells was studied over a 72 h period. Proliferation of GL-15 cells was significantly inhibited by rutin over a concentration range of 10 to 100  $\mu$ M in a dose-dependent manner (Fig. 2A), as shown by  $^3\text{H}$ -thymidine incorporation and growth curves of viable cells. Maximum growth inhibition was obtained on the third day of treatment at the highest concentration tested. Such an inhibitory effect has previously been observed on rat

C6 and human U138MG glioma cell lines, induced by the rutin derivative quercetin (Chen, Jeng, Lin, Wu, & Chen, 2006, Braganhol et al., 2006). ERK is activated by MAPK in response to growth stimuli and involved in diverse cellular signalling pathways including those regulating survival and proliferation (Krzeminski, 2005). We observed a rapid reduction in phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (P-ERK1/2). This effect has also been recently observed for the flavonoid kaempferol in relation to growth inhibition of human glioma cells (Jeong, Cheon, Kim, Kim & Kim, 2009).

In the inhibitory concentration range tested, rutin was not found to be cytotoxic for GL-15 cells after 24 h exposure, as assessed by trypan blue and Annexin V-FITC/Propidium iodine assays. Necrosis is an unregulated event that comprises the release of cellular components into the extracellular medium. In contrast, apoptosis leads to an organised elimination of cellular components (Vaux & Strasser, 1996) and is defined by key events that are controlled by pro- and anti-apoptotic regulators. Common events in apoptosis include chromatin condensation and translocation of phosphatidyl serine to the outer cell membrane (Kokileva, 1994), as well as proteolytic activation of caspases, cytochrome c release from mitochondria, DNA fragmentation and membrane blebbing (Vaux & Strasser, 1996; Adrain & Martin, 2001). All of these events can be used as markers in the detection of apoptosis. We observed by Annexin V-FITC/Propidium iodine and Hoechst 33258 staining that rutin induces apoptosis in GL-15 glioblastoma cells. The proportion of membrane-damaged cells as determined by trypan blue staining was evident after 24 h exposure to 100  $\mu$ M rutin and 72 h exposure to 50-100  $\mu$ M rutin. Because apoptosis (but not necrosis) was detected after 24 h exposure to 100  $\mu$ M rutin, the membrane instability observed after 72 h of rutin exposure may be attributed to cells that underwent apoptosis. Some flavonoids have the ability to interact directly with DNA and/or enhance carcinogen activation of DNA-modifying agents (Hodek et al., 2006); therefore, we tested the potential of rutin to induce DNA strand breaks in GL-15 cells. We observed that at the highest concentration adopted (100  $\mu$ M), rutin induced a low but significant increase in the comet rate (i.e., frequency of DNA breaks). Because fragmentation of DNA is another event that characterises apoptosis (Heatwole, 1999), the DNA strand breaks observed in GL-15 cells exposed to rutin might be attributed to apoptosis. Associations between DNA strand breaks (revealed by the

comet test), chromatin condensation and Annexin V labelling have been reported as being indicative of apoptosis in other cell systems (Morley et al., 2006). A small proportion of cells with DNA damage were observed in control conditions, but as described by Tice et al. (2000), this result may be due to the high sensitivity of the comet test. Similar frequencies of DNA damage in control conditions have also been described in another *in vitro* study using genotoxic alkaloids (Boeira, Silva, Erdtmann & Henriques, 2001), and are probably due to the characteristics of tumour cell lines. Together, these results indicate that, in addition to growth inhibition, rutin induces apoptosis in GL-15 glioblastoma cells.

As revealed by phase microscopy and by vimentin and GFAP immunocytochemistry, rutin has a morphogenic effect on GL-15 cells that is especially evident after 72 h exposure to the highest growth inhibitory concentrations of 50-100  $\mu\text{M}$  (Figs. 3 and 4). Vimentin is a major cytoskeletal component of immature astrocytes (Dahl, Rueger, Bignami & Osbom, 1981), and GFAP is a major protein of astrocyte intermediate filaments and a specific marker for these cells. Moreover, studies have reported that an increase in GFAP content is related to differentiation of malignant gliomas (Rutka et al., 1994). Thus, besides a morphogenic effect of this flavonoid, immunocytochemistry and western blots for vimentin and GFAP revealed that this flavonoid induces differentiation of GL-15 glioblastoma cells towards an astroglial phenotype. This differentiation was especially evident at 50  $\mu\text{M}$ , when both, the proportion of GFAP-positive cells and GFAP steady-state levels increased. When rutin was used at 100  $\mu\text{M}$ , we observed an increase in vimentin steady-state level and immunostaining after 72 h. Vimentin is highly expressed early in development in both radial glia (Sancho-Tello, 1995) and radial glia-like Bergmann cells in the mature cerebellum (Alonso, 2001). Vimentin overexpression in the GL-15 cells remaining after 100  $\mu\text{M}$  rutin exposure suggests that these remaining cells may recapitulate a radial glial-like phenotype. GFAP was barely detected by western blot; its expression was however evident in the remaining GL-15 cells by immunocytochemistry, which suggests that GFAP disruption might interfere with western blot detection rather than supporting a down regulation. Sagara, Vanhnasy and Maher (2004) investigated the differentiation potential of many flavonoids and found that the aglycone quercetin induced differentiation of rat neural PC12 cells but rutin did not, even when it was employed at 100  $\mu\text{M}$ . The authors deduced that structural determinants were needed

for the differentiation activity induced by flavonoids. They observed that all active flavonoids possess a catechol structure on the B ring (C3' and C4'), an unsaturated C ring with an oxygen keto group on C4, and a hydroxyl group on C7 in the A ring. Rutin possesses all of these chemical characteristics but, in addition, it contains a glycosyl moiety at C3 on the A ring that may interfere with its differentiation activity for rat PC12 neuronal cells but not human GL-15 glioblastoma cells.

As described, different flavonoids present considerable variation in blood–brain barrier (BBB) permeability (Youdim, Qaiser, & Begley, 2004; Fernades et al., 2006). It was observed that flavonoids including flavonoid glycosides, naringenin, quercetin, hispidulin, hesperetin, naringenin cross the BBB, due either to their lipophilic nature or to their interactions with specific efflux transporters expressed in the BBB. Although flavonoids can access to the brain, it is clear that these substances and their metabolite forms reach lower concentrations in vivo than those recorded for small-molecule antioxidant nutrients such as ascorbic acid and  $\alpha$ -tocopherol (Youdim, Qaiser, & Begley, 2004). Consequently, the beneficial effects of flavonoid metabolites in vivo, do unlikely result from their ability to out-compete antioxidants such as ascorbate, which are present in higher concentrations. It rather supports the hypothesis that these natural polyphenol compounds might be regarded as potential neuroprotective agents in vivo. Nevertheless, it is evident that flavonoids are potent bioactive molecules, and a clear understanding of their mechanism of action is crucial to the evaluation of their therapeutic potential.

Collectively, our results have shown that the flavonoid rutin present a capacity to inhibit growth and induce differentiation of cultured glioblastoma cells, suggesting that this compound could be considered as a candidate for the treatment of malignant gliomas. Further studies are under investigation to better understand the mechanism of action of rutin on glioblastoma cells.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), and Banco do Nordeste do Brasil (BNB). We gratefully

acknowledge the research support provided by Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

## References

1. Adrain, C., Martin, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemistry Science*, 26(6), 390–39.
2. Alonso, G. (2001). Proliferation of progenitor cells in the adult rat brain correlates with the presence of vimentin-expressing astrocytes. *Glia*, 34(4), 253-266.
3. Bocchini, V., Casalone, R., Collini, P., Rebel, G., Lo Curto, F. (1991). Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell and Tissue Research*, 265(1), 73-81.
4. Boeira, J.M., DA Silva, J., Erdtmann. B., Henriques, J. A. P. (2001). Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 89(6), 287-294.
5. Braganhol, E., Zamin, L. L., Canedo, A. D., Horn F., Tamajusuku, A. S., Wink, M. R., Salbego, C., Battastini, A. M. (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*, 17(6), 663-671.
6. Brandes, A. A., Pasetto. L. M., Monfardini. S. (2000). New drugs in recurrent high grade gliomas. *Anticancer Research*. 20(3), 1913-1920.
7. Chen, T.J., Jeng, J. Y., Lin, C. W., Wu, C.Y., Chen, Y.C. (2006). Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology*, 223, 113- 126.
8. Costa, S. L., Paillaud, E., Fages, C., Rochette-Egly, C., Plassat, J. L., Jouault, H., Perzelova, A., Tardy, M. (2001). Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *European Journal of Cancer*, 37(4), 520-530.

9. Dahl, D., Rueger, D. C., Bignami, W. K., Osbom, M. (1981). Vimentin, the 57,000 dalton protein of fibroblasts, is the major cytoskeletal component in immature glia. *European Journal of Cell Biology*, 24(6), 191-196.
10. Deschner, E. E., Ruperto, J., Wong, G., Newmark, H. L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12(7), 1193-1196.
11. Fernandez, S.P., Wasowski, C., Loscalzo, L. M., Granger, R. E., Johnston, G. A. R., Paladini, A. C., Marder, M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*, 539(3), 168-176.
12. Fresco, P., Borges, F., Diniz, C., Marques, M.P. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6), 747-766.
13. Heatwole, V. M. (1999). TUNEL assay for apoptotic cells. *Methods in Molecular Biology*, 115(3), 141-148.
14. Hodek, P., Hanustiak, P., Krížková, J., Mikelova, R., Krížková, S., Stiborová, M., Trnková, L., Horna, A., Beklová, M., Kizek, R. (2006). Toxicological aspects of flavonoid interaction with biomacromolecules. *Neuroendocrinology Letters*, 27(2), 14-17.
15. Krzeminski, P. (2005). Modulation of ERK1/2 activity is crucial for sphingosine-induced death of glioma C6 cells. *Acta Biochim Pol.* 52, 927-930.
16. Kokileva, L. (1994). Multi-step chromatin degradation in apoptosis. DNA breakdown in apoptosis. *International archives of allergy and immunology*, 105(4), 339-343.
17. Louis, D.N, Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*, 114(2):97-109.
18. Jeong, J. I., Cheon, Kim, M. S., Kim, T. H., & Kim, Y. K. (2009). Kaempferol Induces Cell Death Through ERK and Akt-Dependent Down-Regulation of XIAP and Survivin in Human Glioma Cells. *Neurochemical Research*, 34(5), 991-1001.
19. Lamartiniere, C. A., Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Wang, J., Mentor-Marcel, R., Elgavish, A. (2002). Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition*. 132(3), 552-558.

20. Lipkin, M. (1999). Dietary factors in human colorectal cancer. *Annual Review of Nutrition*, 19(1), 545-586.
21. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
22. Morley, N., Rapp, A., Dittmar, H., Salter, L., Gould, D., Greulich, K. O., Curnow, A. (2006). UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis Advance Access*, 24(2), 105-114.
23. Ramos, S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(7), 427-442.
24. Ribeiro, D. A. (2006). Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Brazilian Dental Journal*, 17(2), 91-94.
25. Robbers, J. E., Tyler, V. E., Speedie, M. K. (1997). Farmacognósia e Farmacobiocologia. Brasil. Editora: Editorial Premier. 157-158.
26. Rutka, J. T., Hubbard, S. L., Fukuyama, K., Matsuzawa, K., Dirks, P. B., Becker, L. E. (1994). Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on growth, invasion, and adhesion of human astrocytomas cells. *Cancer Research*, 54(12), 3267-3272.
27. Sagara, Y., Vanhnasy, J., Maher, P. (2004). Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *Journal of neurochemistry*, 90(5), 1144-1155.
28. Sancho-Tello, M. (1995). Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia*, 15(2), 157– 166.
29. Silva, A. R., Pinheiro, A. M., Souza, C. S., Freitas, S. R. V. B., Vasconcellos, V., Freire, S. M., Velozo, E. S., Tardy, M., El-Bachá, R. S., Costa, M. F. D., Costa, S. L. (2008). The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology*, 24(1), 75-89.
30. Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell



- gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
31. Vaux, D. L., Strasser, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6), 2239–2244.
  32. Yang, K., Lamprecht, S. A., Liu, Y., Shinozaki, H., Fan, K., Leung, D., Newmark, H., Steele, V. E., Kelloff, G. J., Lipkin, M. (2000). Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*, 21(9), 1655-1660.
  33. Youdim, K.A., Qaiser, M.Z., Begley, D.J. (2004) Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 592–604.

## Figure Legends

**Figure 1 – Effect of rutin on viability and proliferation of GL-15 cells.** Cells were incubated in the absence (control, 0.5% DMSO) or presence of rutin at different concentrations (1-100  $\mu$ M), and cell viability was assessed by Trypan blue staining after 24 h or 72 h treatment. **(A)** Proportion (%) viable and non-viable (blue) cells after 72 h exposure and Trypan blue staining; (\*) = Significant difference from control (0.5% DMSO) values ( $P \leq 0.05$ ) referring the number of non-viable cells; (#) = Significant difference from control (0.5% DMSO) values ( $P \leq 0.05$ ) referring the number of viable cells. **(B)** Proliferation assessed by  $^3$ H-thymidine incorporation after 24 h or 72 h of the experiment; values for vehicle control samples were set at 100%; (\*) = Significant differences from control values ( $P \leq 0.05$ ). **(C)** DNA content analysis by flow cytometry after a 48 h experiment; the DNA content is shown by relative fluorescence and the number of cells in the G0/G1 phase are represented in the first peak, whereas those in the G2/M phase are in the second peak. Cells in S phase are present in the area between the G0/G1 and G2/M peaks. **(D)** Expression of phosphorylated and non-phosphorylated ERK proteins (p44/p42) from GL-15 cells in control conditions and after 24 h exposure to rutin, as determined by western blot. Results are from at least three independent experiments.

**Figure 2 – Effect of rutin on morphology and on vimentin and GFAP expression in GL-15 cells.** **(A)** Photomicrographs after Rosenfeld's staining and immunocytochemistry for vimentin and GFAP proteins in GL-15 cells under control conditions (0.5% DMSO) or treated for 72 h with 50-100  $\mu$ M rutin. Objective 20 x 0.70, scale bars = 10  $\mu$ m. This result is representative of three independent experiments. **(B)** The absolute cell number, vimentin positive cells, and GFAP positive cells were quantified. To normalize the variation between absolute numbers from different experiments, data are represented as proportion (%) for each marker. **(C)** Western blot analysis of vimentin and GFAP protein expression in GL-15 cells treated with rutin. Samples containing 20  $\mu$ g of total protein for control conditions (0.5% DMSO) or treated for 72 h with rutin (10-100  $\mu$ M) were electrophoretically separated through 12% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS in running buffer.

The immunoreactive bands are representative of three independent experiments and the histogram represents the relative expression of vimentin and GFAP.

**Figure 3 – Induction of apoptosis by rutin in human GL-15 cells as revealed by flow cytometry.** Identification of phosphatidyl serine translocated to the outer cell membrane by Annexin V-FITC, and determination of propidium iodide-positive cells after a short time exposure (24 h).

**Figure 4 – Features of apoptosis in GL-15 cells after rutin exposure.**

**(A)** Morphological analysis of GL-15 cell nuclei in control conditions (0.5% DMSO) and nuclear condensation detection by Hoechst 33258 dye in cells treated with 50 or 100  $\mu$ M rutin after 72 h. Arrows represents apoptotic bodies and fragmented nuclei; Objective 20 x 0.70, scale bars = 10  $\mu$ m; this result is representative of three independent experiments. **(B)** Determination of DNA strand breaks in GL-15 cells exposed to rutin after 24 h and 72 h, using the comet assay. Cells were exposed to vehicle control (0.5% DMSO), rutin (100  $\mu$ M) or UV irradiation (positive control). Data represents comet rates (mean  $\pm$  SD) for at least 100 nucleoids of GL-15 cells per experimental point in three independent experiments; (\*) = Significant differences from control values ( $P \leq 0.05$ ).

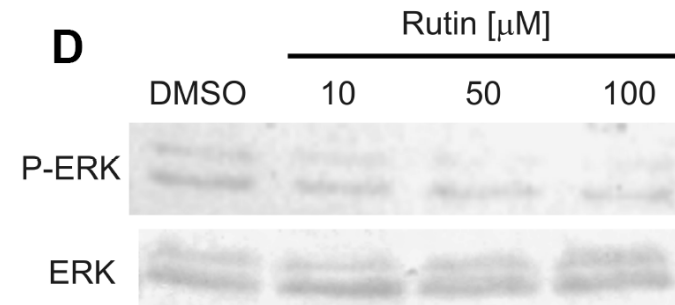
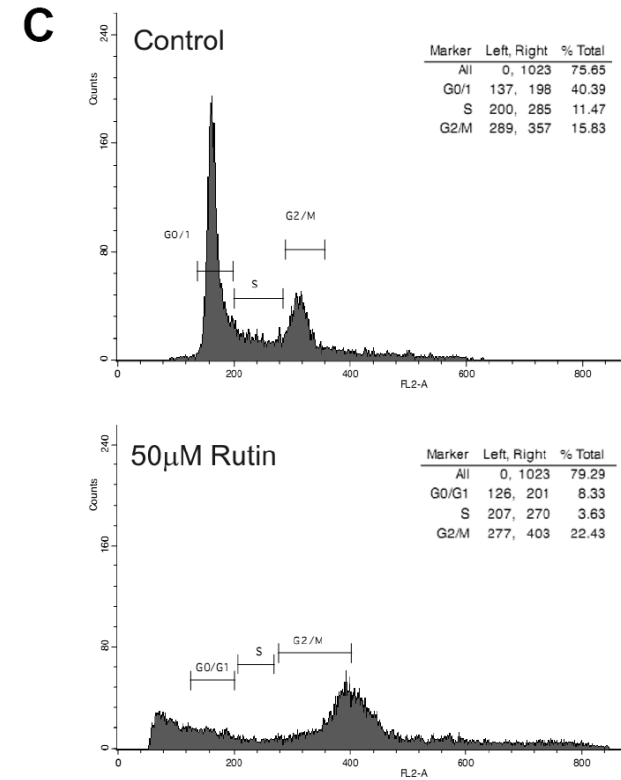
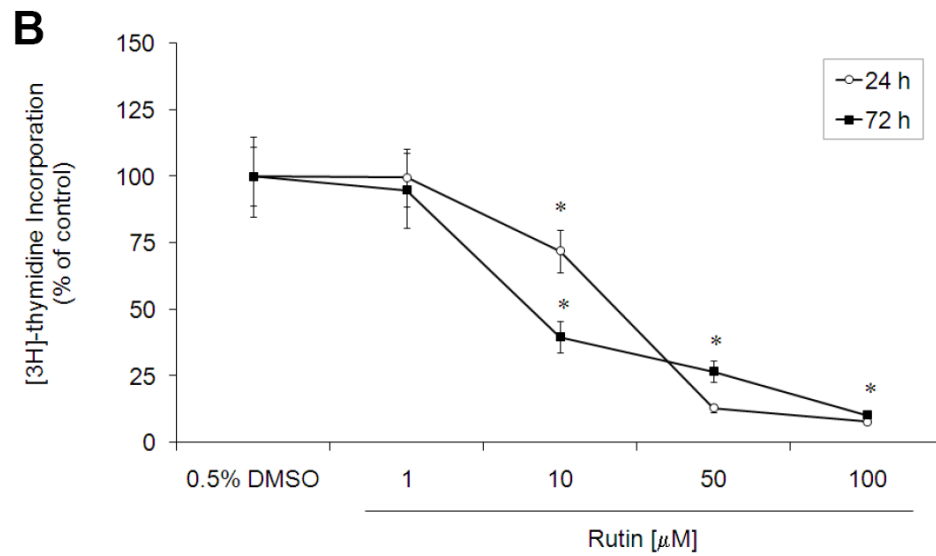
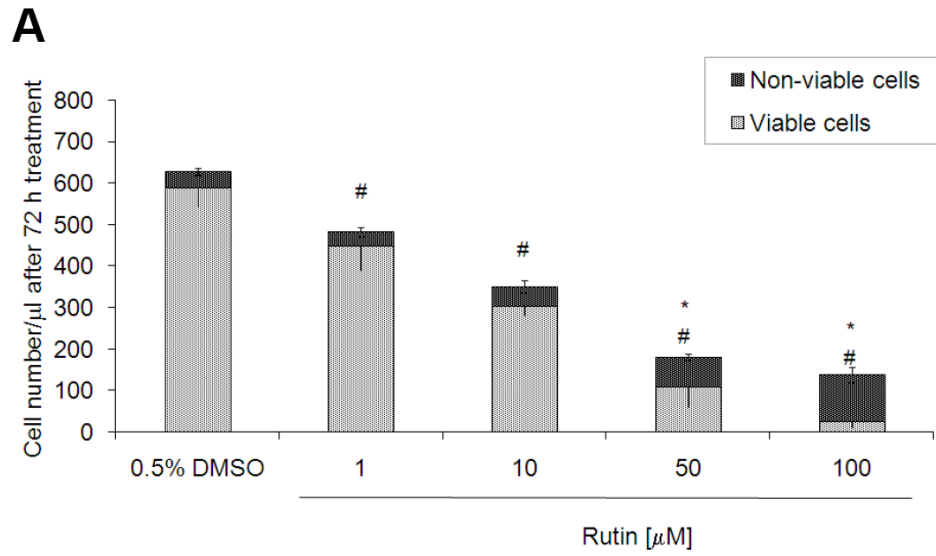


Figure 1

**A**

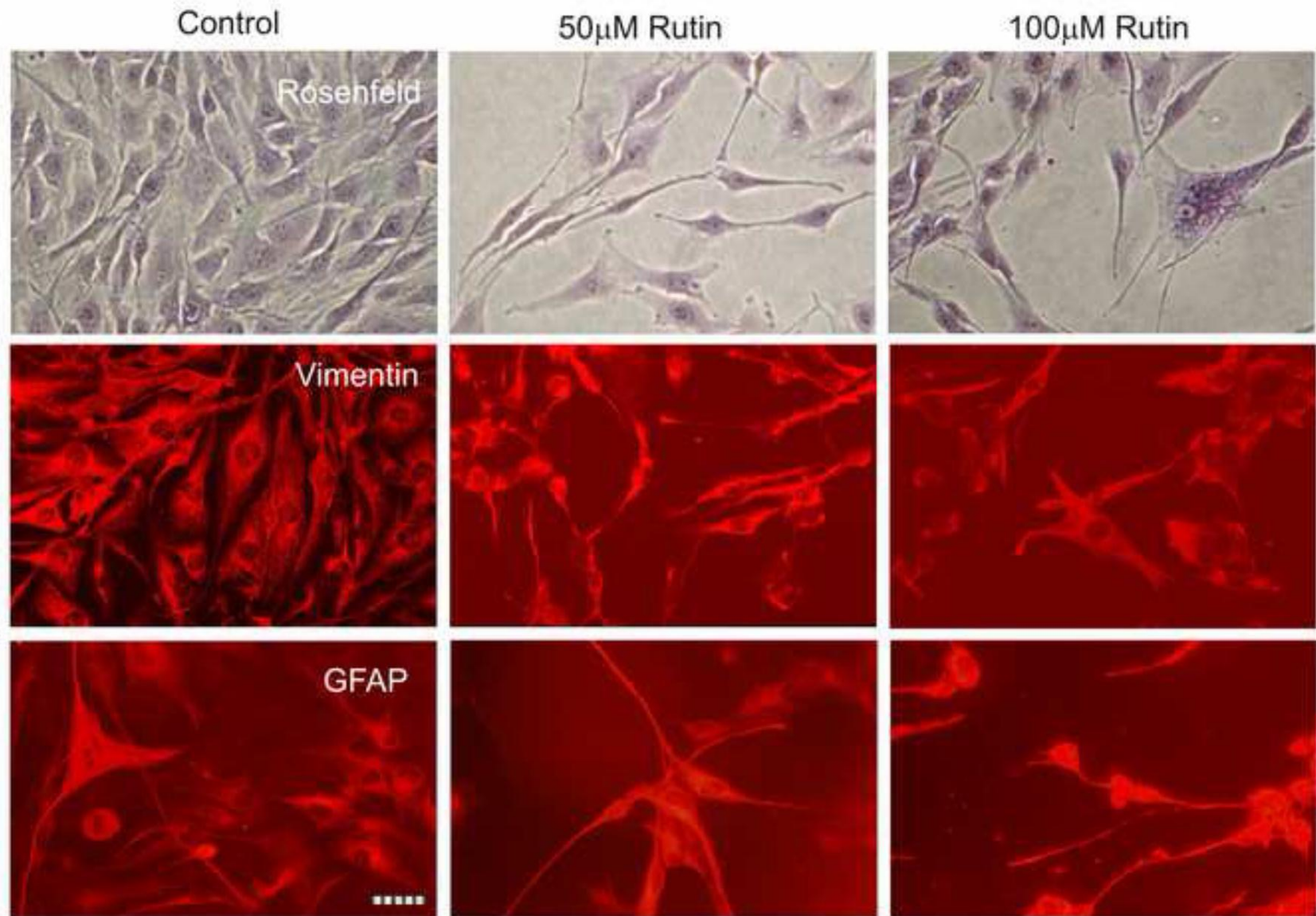


Figure 2A

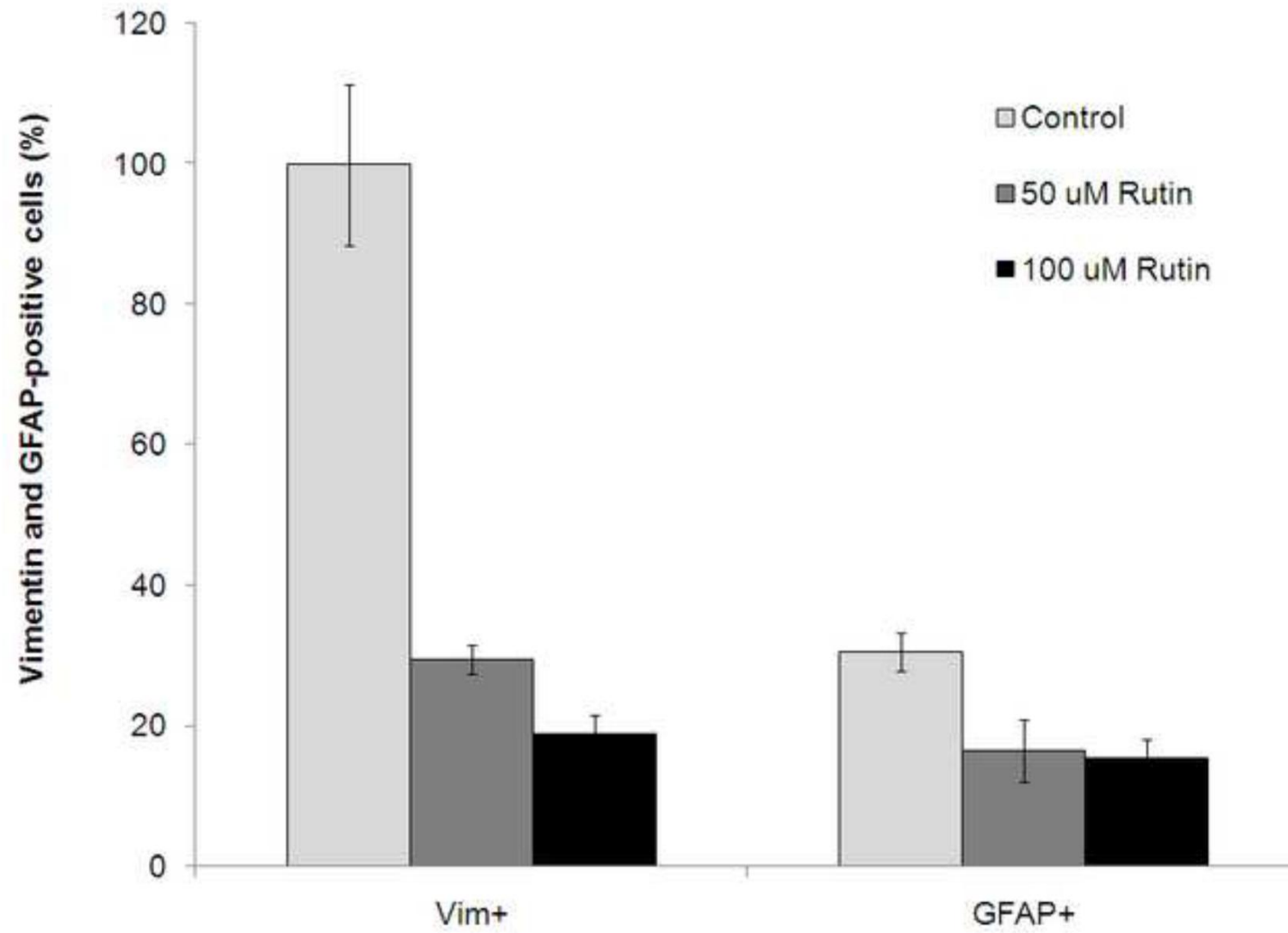
**B**

Figure 2B

C

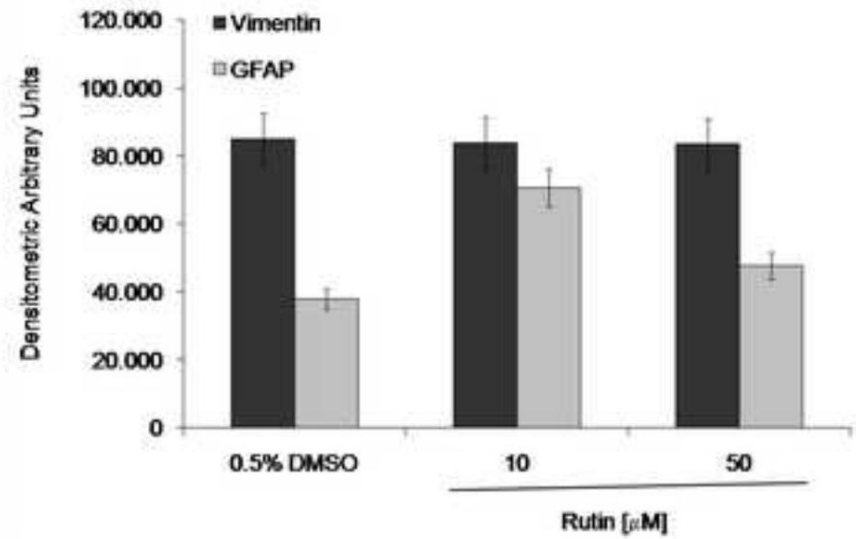
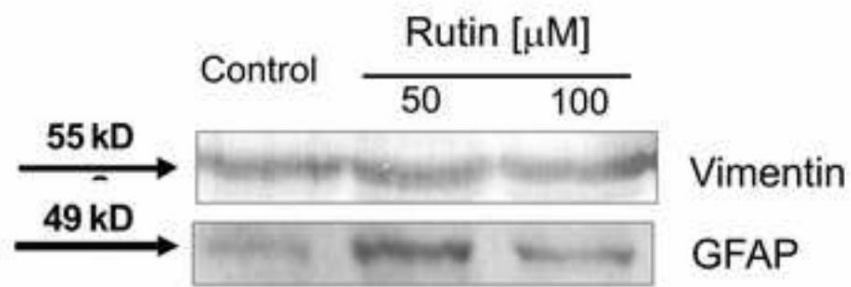


Figure 2C

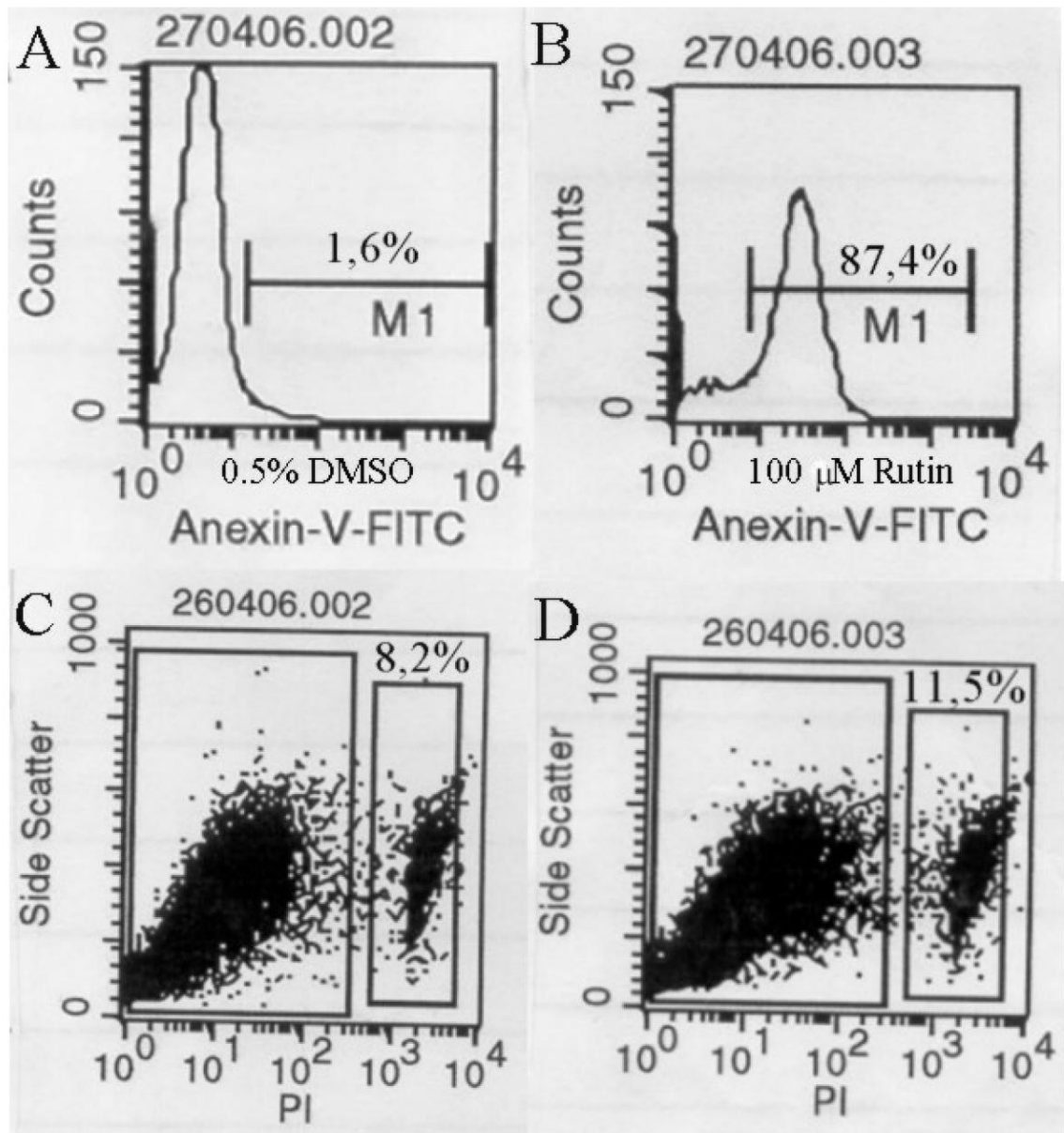


Figure 3



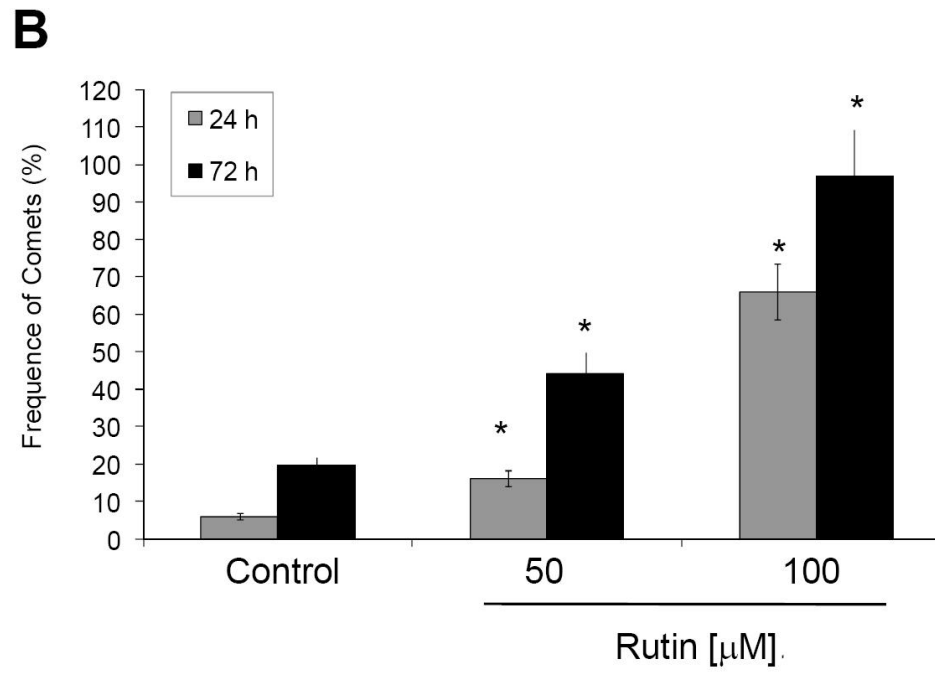
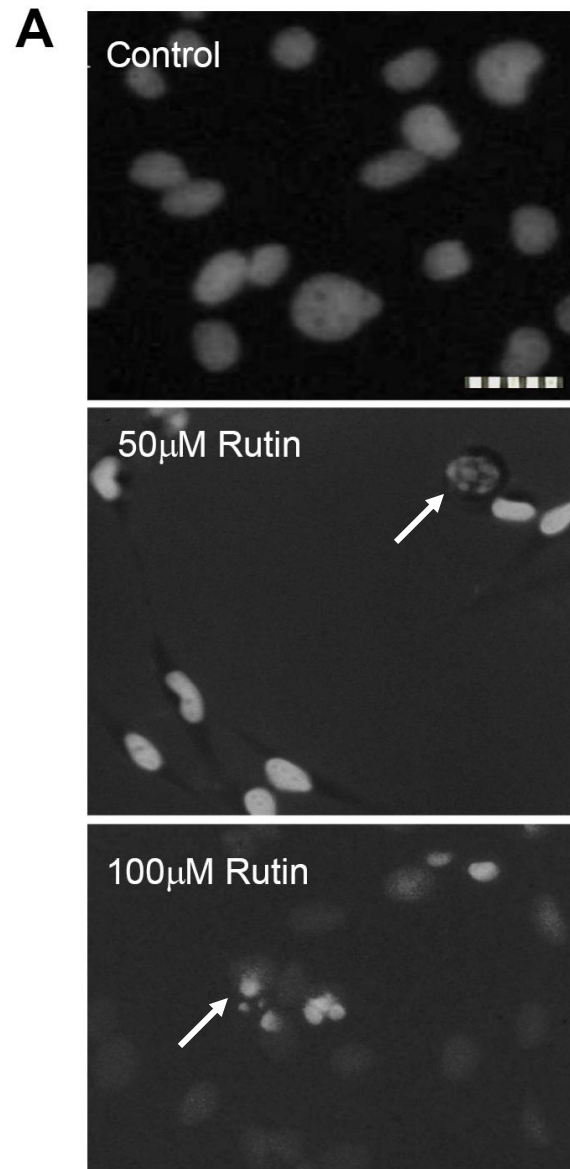


Figure 4

## **CAPÍTULO 2: EFEITOS *IN VITRO* DE FLAVONÓIDES POLIHIDROXILADOS NA VIABILIDADE, MIGRAÇÃO E EXPRESSÃO DE COMPONENTES DE MATRIZ EXTRACELULAR EM CÉLULAS DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME HUMANO.**

Santos, B.L., Oliveira, M.N., Coelho, R.A., Pitanga, C.S., Sousa, C.S., Costa, M.F.D., El-Bachá, R.S., Tardy, M., Costa, S.L.

### **RESUMO**

Neste estudo investigamos o efeito de flavonóides polihidroxiados 5,7-dihidroxiavona (crisina), 3',4'-dihidroxiavona, 4',5,7-trihidroxiavona (apigenina), 3,4',5,7-tetrahidroxiavona (kaempferol), 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona (quercetina), e 3-O-rutinosídeo de 3,3',4',5,7-pentahidroxiavona (rutina) na viabilidade celular, modificação fenotípica e na capacidade invasiva e migratória em cultura de células de glioblastoma multiforme humano da linhagem GL-15. Nós observamos que os flavonóides crisina, apigenina e 3',4'-dihidroxiavona induziram uma pequena redução na viabilidade das células GL-15 após 48 h de tratamento, além de mudanças ultraestruturais indicativas de apoptose. Os flavonóides avaliados também mostraram ser morfogênicos para células GL-15, induzindo a um fenótipo bipolar semelhante a glia radial, caracterizada pela presença de um corpo celular condensado e finos processos citoplasmáticos, com expressão de GFAP. A análise por microscopia eletrônica de varredura também revelou uma redução de estruturas tipo filopodias na superfície celular, após tratamento com os flavonóides em estudo. Observamos que os flavonóides induziram um retardo na migração das células GL-15 em ensaios de migração após as primeiras 12 h de tratamento, bem como regularam a expressão de proteínas componentes da MEC, sendo observada marcação intra e extracelular para a fibronectina e marcação predominantemente intracelular para a laminina. Podemos também evidenciar que todos os flavonóides testados induziram uma redução na expressão e na atividade de MMPs, e que a expressão de CX43 foi reduzida após tratamento com rutina. Devido à capacidade de induzir a diferenciação, inibir migração celular e induzir a apoptose em cultura de células de glioblastoma humano, flavonóides polihidroxiados podem ser considerados como potentes candidatos para o tratamento de gliomas malignos.

**Palavras-chave:** flavonóides, glioblastomas, apoptose, diferenciação, MEC, MMP.

## 1. Introdução

Os gliomas malignos são tumores cerebrais primários muito comuns (BURGER, et al., 1985). São responsáveis por cerca de 40% de todos os tumores primários e, por cerca de 78% de todos os tumores malignos do sistema nervoso central. Mais de 80% desses tumores são considerados de alto grau (graus III e IV) quando diagnosticados de acordo com a atual classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). Os glioblastomas multiformes (GBMs) compreendem formas agressivas de gliomas, altamente infiltrativos que acomete o cérebro e são morfológicamente muito heterogêneas. Em outras palavras, a composição celular, mesmo dentro de um tumor único, pode variar amplamente (MILLER & PERRY, 2007; CLARKE, BUTOWSKI & CHANG, 2010). Atualmente, o protocolo de escolha para o tratamento de pacientes com glioblastoma multiforme baseia-se na cirurgia e radioterapia seguida de quimioterapia com temozolamida - TMZ (STUPP, et al., 2007; SOFFIETTI, et al., 2007). Entretanto, apesar dos avanços no tratamento, a expectativa média de vida dos pacientes com GBM é de aproximadamente 14 meses, sendo que um pequeno número de pacientes pode sobreviver até cerca de 5 anos após o diagnóstico (GOFFMAN, et al., 1992; SENGER, et al., 2003). A excessiva proliferação, a difusa capacidade de infiltrar o tecido cerebral circundante e a supressão da resposta imune antitumoral são aspectos biológicos cruciais que contribuem para o fenótipo maligno de gliomas e que limitam o sucesso dos atuais protocolos terapêuticos (WICK, et al., 2001). A invasão do tumor é um processo complexo, em que a célula neoplásica inicia a migração no sítio primário do tumor, adere à matriz extracelular (MEC) e degrada os componentes de MEC, através de enzimas proteolíticas que invadem tecidos normais distantes. Portanto, os elementos cruciais para a invasão do tumor incluem a adesão e a migração, que promovem interações entre a célula tumoral e os componentes de MEC que envolvem o tumor (DEMUTH, et al., 2004; OHNISHI, *et al.*, 1998).

A matriz extracelular (MEC) é uma complexa rede organizada de moléculas que são tipicamente grandes glicoproteínas, incluindo fibronectinas, colágenos, lamininas e proteoglicanos, que montam fibras ou outros arranjos macromoleculares (MA, *et al.*, 2008). A MEC funciona com um reservatório de fatores de crescimento e

fluidos, desempenha papel importante na organização de tecidos, microambientes celulares e nichos de células tronco. Ela é tecido específica e se adapta a mudanças no desenvolvimento, na idade e doença (SINGH, CARRAHER & SCHWARZBAUER, 2010). As enzimas matriz metaloproteinases (MMPs) correspondem a uma família de endopeptidases que seletivamente degradam componentes de matriz extracelular (MEC). As MMPs estão implicadas na migração e invasão de células tumorais, pois elas favorecem uma degradação proteolítica da membrana basal (WICK, *et al.*, 2001; NAKADA, *et al.*, 1999). Dentre as MMPs, a MMP2 (gelatinase A) tem sido amplamente estudada por estar envolvida na malignidade de células tumorais (NAKADA, *et al.*, 1999).

Os flavonóides correspondem a um grupo de componentes polifenólicos, originados de diversas espécies de plantas, que apresentam baixo peso molecular. Eles exibem uma variedade de atividades biológicas tais como atividade antiinflamatória, antioxidante, antiviral e ações antitumorais (SUK, K., 2002). A inibição do crescimento de células cancerígenas, *in vitro* e *in vivo*, pelos flavonóides, tem sido relatada em vários trabalhos (SANTOS *et al.*, 2011; GRAZIANI *et al.*, 1983; EDWARDS *et al.*, 1979; KURIKI AND RACKER , 1976). Flavonóides como quercetina e rutina, encontrados comumente na dieta, tem apresentado atividade antiproliferativa, apoptótica e morfogênica em células de glioma *in vitro* (SANTOS, *et al.*, 2011; NGUYEN, *et al.*, 2004). Outros flavonóides têm sido também associados a inibição da atividade de migração e invasão de vários tipos de tumores (LIN, *et al.*, 2008; SHEN, *et al.*, 2010; WANG, *et al.*, 2010). Apesar disto, ainda são poucos os estudos que avaliam os mecanismos pelos quais diversos flavonóides usam para inibir o crescimento e a migração dos tumores. A compreensão do papel dos flavonóides sobre o crescimento, a viabilidade e sobre os processos de migração e invasão de gliomas, poderá ajudar a elucidar a atividade anti-tumoral destes produtos naturais e contribuir, desta forma, para gerar novos candidatos potenciais para o tratamento de gliomas. Portanto, neste estudo, nós investigamos os efeitos de flavonóides polihidroxilados sobre a viabilidade celular, modificação fenotípica e na capacidade invasiva e migratória em células de glioblastoma multiforme humano da linhagem GL-15, estabelecida por Bocchini e *co/s* (1991).

## 2. Materiais e Métodos

## 2.1. As drogas e tratamentos

Os flavonóides rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona) e quercetina (3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona), extraídos da *Dimorphandra mollis*, o flavonóide apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona), extraído de *Croton betulaster*, e os flavonóides crisina (5,7-dihidroxi-flavona), kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone) e 3',4'-dihidroxi-flavona (Quadro 1), extraídos de *Caesalpynia pyramidalis*, todos provenientes do estado da Bahia, foram obtidos sob a forma de pó no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais (Instituto de Química/UFBa), e no Laboratório de pesquisa de Produtos Naturais (Faculdade de Farmácia/UFBa). Eles foram dissolvidos no dimetilsulfoxido (DMSO) formando soluções estoque a 20mM, que foram mantidas na obscuridade a -20°C. As diluições finais de cada reagente foram obtidas no momento do tratamento, diluindo-se as soluções concentradas diretamente no meio de cultura.

## 2.2. Culturas de células

As linhagens de glioblastoma GL-15 (BOCCHINI et al., 1991) derivada de glioblastoma multiforme humano, com até 20 passagens, foram cultivadas até confluência em placas de poliestireno (TTP, Suíça) de 100 milímetros de diâmetro, contendo 10 mL do meio a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. O meio usado foi o Eagle modificado Dulbecco's (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO BRL, Grand Island, NY), uma mistura dos nutrientes (glicose a 7 mM; glutamina a 2 mM; piruvato a 0,011 g/L), e na presença de antibióticos (100 UI/ml de penicilina G e 100 mg/ml de estreptomicina). As culturas foram mantidas em uma atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. O meio foi substituído por três vezes durante a semana. As culturas de estoque foram repicadas em placas de cultura novas a cada 3 dias, e as culturas para os experimentos foram semeadas em placas de cultura de poliestireno, conforme necessário. Após cerca de 24h de crescimento, quando as células atingiram a confluência necessária (formação de uma monocamada celular), fez-se a tripsinização e repicagem das células em outros

modelos de placas de cultura (placas de 96 poços, 24 poços ou 06 poços), segundo os diferentes procedimentos analíticos a serem realizados.

### **2.3. Teste de citotoxicidade e viabilidade celular**

Para o teste de citotoxicidade, as células de glioblastoma foram cultivadas em placas de 96 poços. As células foram expostas às drogas por cerca de 48h e, duas horas antes do término do tempo de exposição, o meio de cultura foi substituído por uma solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), diluído em meio DMEM (5mg/ml) e, em seguida a placa foi incubada por mais 2h. Para a dissolução dos cristais de formazan formados pela ação das desidrogenases mitocondriais sobre o substrato MTT, foi acrescido um volume de um tampão de lise (20% SDS, 50% DMF, pH 4,7), mantendo-se as placas por cerca de 12 h a 37°C. A absorvância óptica de cada amostra foi medida usando o espectrofotômetro BIO-RAD 550PLUS em um comprimento de onda de 492 nm.

A viabilidade celular foi obtida após a coloração pelo azul Trypan do grupo controle e das células tratadas com os flavonóides polihidroxilados, após semeadura em placas de cultura de poliestireno de 40mm de diâmetro ( $1.5 \times 10^5$  células / placa). Ambas as células aderentes e flutuantes foram obtidas após tripsinização e centrifugadas por cerca de 10 minutos a 1500 RPM. As células foram então suspensas em 200 $\mu$ L de meio DMEM sem suplementação com SFB e, em seguida, coradas com azul de Tripán a uma concentração final de 0,1% (v / v). Três replicatas dos experimentos foram realizados para cada análise e, o número de células viáveis e não viáveis (azuis) por mL foi determinado após 48 h de exposição aos flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, pela contagem de quatro amostras de 10 $\mu$ L de suspensão celular para cada experimento, em câmara de Burker (Boehringer Mannheim).

### **2.4. Análises morfológicas e estruturais**

Os efeitos dos flavonóides nas células GL-15 em termos de modificações morfológicas e estruturais, foram investigados através de análise microscópica em

contraste de fase, através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e através da marcação imunocitoquímica para a proteína do citoesqueleto GFAP (marcador para astrócito).

As células foram semeadas em placas de cultura de poliestireno de 24 poços. Nas placas usadas para marcação imunocitoquímica, foram colocadas lamínulas redondas de 13 milímetros de diâmetro em cada poço e em seguida, as lamínulas foram pré-tratadas com poli-D-ornitina. As células GL-15 foram cultivadas nestas placas e, após estarem confluentes (formarem uma monocamada celular homogênea na superfície da lamínula), as células foram tratadas com os diferentes flavonóides e, decorrido o tempo de exposição aos flavonóides (48 horas), o tapete celular foi lavado três vezes com PBS e as células foram então fixadas e permeabilizadas com metanol gelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos (para marcação imunocitoquímica), ou com solução fixadora (glutaraldeído a 2%; tampão cacodilato de sódio a 0,1M pH 7,4) por 12h a  $4^{\circ}\text{C}$ , usada para microscopia eletrônica de varredura.

### **Microscopia com contraste de fase**

Após 48 horas de exposição aos flavonóides, os aspectos morfológicos foram analisados em microscopia com contraste de fase, com filtro verde (Nikon TS-100) e, em seguida, fotografadas por uma câmara digital (Nikon E-4300). Foram analisadas 10 fotos para cada tratamento em 3 experimentos independentes.

### **Marcação imunocitoquímica**

Para realizar a marcação imunocitoquímica, após exposição aos flavonóides, o meio de cultura foi coletado e armazenado e o tapete celular foi lavado por três vezes com solução tampão PBS. As células foram fixadas com metanol (como explicado anteriormente) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS e em seguida, incubadas por 1 hora com anticorpo primário anti-GFAP (Santa Cruz) produzido em coelho, na diluição 1:200 em PBS-T, sob leve agitação. Decorrido o tempo de incubação, as células

foram lavadas com PBS (3X de 200 $\mu$ L) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 (Invitrogen corporation), diluído 1:5000 em PBS-T, sob agitação lenta, por 1h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA, DAPI (5 $\mu$ g/ml), durante 10 minutos à temperatura ambiente e, o citoplasma corado com o corante Evans Blue (10mg/mL – Fluka) por cerca de 10 minutos. As células foram então lavadas com PBS (3x 200 $\mu$ l), analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX70) e fotografadas com filme Kodak Cromo ISO100 em câmera Olympus AX-70.

### **Microscopia eletrônica de varredura (MEV).**

Após período de tratamento com os flavonóides, desprezou-se o meio de cultura e fixou-se o tapete celular, conforme explicado anteriormente. Em seguida, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio a 0,1M em pH 7,4 (3 banhos de 5 minutos a TA). Após lavagem, as células foram pós-fixadas com solução de tetróxido de ósmio a 1% (tetróxido de ósmio 2% + cacodilato de sódio a 0,2M, v/v). Foi adicionado cerca de 300 $\mu$ L desta solução em cada poço da placa e incubado a placa por cerca de 1 hora a TA. Após esta fixação, foi realizada outra etapa de lavagem das células com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 (3X de 10 minutos). Em seguida a etapa de lavagem, as células foram desidratadas em solução alcoólica, nas concentrações 30%, 50%, 70% e 90%, sendo 1 banho de 10 minutos para cada concentração, e na concentração 100%, sendo 3 banhos de 10 minutos. A desidratação também foi realizada à temperatura ambiente (TA). Após esta etapa, as células foram submetidas ao ponto crítico no equipamento Leica EM CPD030. O ponto crítico corresponde a substituição da solução desidratante por dióxido de carbono no estado líquido, que por sua vez, com o aumento da temperatura, vaporiza, saindo da célula e mantendo a estrutura celular preservada. Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro, usando o equipamento Denton Vacuun Desk IV, e então analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV JSM 6390LV), no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CPqGM / Fiocruz, Salvador.



## 2.5. Expressão de componentes de MEC

### Marcação imunocitoquímica

A determinação da interferência dos flavonóides na expressão de proteínas da matriz extracelular (MEC), fibronectina e laminina, foi investigada por marcação imunocitoquímica e por *western blot* das proteínas laminina e fibronectina (PLANCHENAUULT et al., 2001).

Para realizar a marcação imunocitoquímica, as células foram cultivadas em placa de 24 poços e após atingirem a confluência, foram tratadas com os flavonóides em estudo. Após 48 horas de exposição aos flavonóides, o meio de cultura foi coletado e armazenado e o tapete celular foi lavado por três vezes com solução tampão PBS. A síntese intracelular foi investigada com marcação após fixação com metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , e a expressão extracelular foi analisada procedendo-se marcação antes da fixação com o metanol. Para marcação intracelular, as células foram fixadas com metanol (como explicado anteriormente) a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS e em seguida, incubadas por 1 hora com os anticorpos primários anti-Fibronectina (F3648, Sigma-Aldrich, Inc) produzido em coelho, na diluição 1:500 em PBS-T, e anti-laminina (L9393, Sigma-Aldrich, Inc) produzido em coelho, na diluição 1:25 em PBS-T, sob leve agitação. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS (3X de 200 $\mu\text{L}$ ) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com fluorocromo isotiocianato de tetrametilrodamina, diluído 1:5000 em PBS-T, sob agitação lenta, por 1h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante do DAPI (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas com PBS (3x 200 $\mu\text{l}$ ), analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX70) e fotografadas com filme Kodak Cromo ISO100 em câmera Olympus AX-70. Para marcação extracelular, o procedimento foi semelhante ao relatado acima, entretanto a fixação em metanol foi realizada após a marcação com os anticorpos primário e secundário. Após fixação em metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , as placas também foram colocadas

para secar ao ar, em ambiente escuro, para então serem analisadas em microscopia de fluorescência e em seguida fotografadas.

## Western blot

Para avaliar a expressão das proteínas de MEC por *western blot*, as células GL-15 foram cultivadas em placas de 6 poços ( $1.5 \times 10^5$  células / poço) até a confluência, e em seguida tratadas com os flavonóides por 48 horas. Após este período, o meio de cultura foi coletado e armazenado. As proteínas totais das células de glioblastoma, em condições controle ou tratadas com flavonóides, foram então extraídas com tampão de extração SDS a 2% (w / v), 2 mM de etileno glicol-bis[ $\beta$ -aminoetil éter]-N, N, N'N'-ácido tetraacético (EGTA), 4 M de uréia, 0,5% (v / v) de Triton X-100, 62,5 mM de tampão Tris-HCl (pH 6,8), suplementado com 1 $\mu$ l/ml de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma, St Louis, MO). O extrato protéico foi colhido e armazenado em microtubos de 2,0mL. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951), usando um kit reagente para dosagem de proteína (Bio-Rad, Hercules, CA). As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose, nas seguintes condições: trinta microgramas de extrato de proteína total foram colocadas no gel de empilhamento a 4%, e no gel de corrida a 8% (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em 200 V por 45 min. Após corrida, as proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.), a 100 V por cerca de 1 h. A presença de proteínas na membrana foi confirmada pela coloração da membrana com Ponceau Red (Sigma). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 h em temperatura ambiente em 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-Fibronectina (F3648, Sigma-Aldrich, Inc) produzido em coelho, na diluição 1:2000 e anti-laminina (L9393, Sigma-Aldrich, Inc) produzido em coelho, na diluição 1:1000, ambos diluídos em TBS-T com 1% de leite em pó desnatado. Como anticorpo secundário, foi usado anticorpo de cabra anti-IgG de coelho, conjugados com fosfatase alcalina, na diluição 1:5000 em TBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado (Bio-Rad, Hercules, Califórnia). O

aparecimento de bandas imunorreativas foram visualizadas após adição do substrato, como descrito pelo fabricante no Kit da Bio-Rad, Hercules, CA. As membranas foram escaneadas (ScanJet 4C - HP) e a quantificação foi obtida pela análise densitométrica de três experimentos independentes, realizadas no software ImageJ 1.33u (Rasband Wayne, National Institute of Health, E.U.A.).

## 2.6. Expressão e atividade de matriz-metaloproteinases (MMPs)

### Western blot

Para investigar a expressão de MMPs em células GL-15 tratadas com flavonóides, foi analisado a expressão das formas inativa e ativa da gelatinase MMP-2 (inativa: 72 kDa e ativa: 63 kDa) através de *western blot*. Também foi avaliada a expressão de MMP-2 intracelular através de imunocitoquímica.

Para análise por *western blot*, as células foram cultivadas em placas de cultura de poliestireno de 06 poços ( $1.5 \times 10^5$  células / poço). Após 48 horas de exposição aos flavonóides, as células foram lavadas duas vezes com PBS, lisadas com tampão de extração SDS a 2% (w / v), 2 mM de etileno glicol-bis[ $\beta$ -aminoetil éter]-N, N, N'-ácido tetraacético (EGTA), 4 M de uréia, 0,5% (v / v) de Triton X-100, 62,5 mM de tampão Tris-HCl (pH 6,8), suplementado com 1  $\mu$ l/ml de um coquetel de inibidores de proteases (Sigma, St Louis, MO). O extrato protéico foi colhido e armazenado em microtubos de 2,0mL. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry (1951), usando um kit reagente para dosagem de proteína (Bio-Rad, Hercules, CA). Trinta microgramas de extrato de proteína total foram colocados no gel de empilhamento a 4%, e no gel de corrida a 8% (SDS-PAGE). A eletroforese foi realizada em 200 V por 45 min. Após corrida, as proteínas foram então transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Hercules, CA, E.U.A.), a 100 V por cerca de 1 h. A presença de proteínas na membrana foi confirmada pela coloração da membrana com Ponceau Red (Sigma). Posteriormente, as membranas foram bloqueadas durante 1 h em temperatura ambiente em 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), contendo 0,05% Tween 20 (TBS-T) e 5% de leite em pó desnatado. Posteriormente, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário anti-MMP-2 produzido em coelho (Santa Cruz), diluído 1:500. A

incubação durou cerca de 1h e o anticorpo foi diluído em TBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado. Como anticorpo secundário, foi usado anticorpo de cabra anti-IgG de coelho, conjugados com fosfatase alcalina, na diluição 1:5000 em TBS-T contendo 1% de leite em pó desnatado (Bio-Rad, Hercules, Califórnia, EUA). O aparecimento de bandas imunorreativas foram visualizadas após adição do substrato, como descrito pelo fabricante no Kit da Bio-Rad, Hercules, CA. As membranas foram escaneadas (ScanJet 4C - HP) e a quantificação foi obtida pela análise densitométrica de três experimentos independentes, realizadas no software ImageJ 1.33u (Rasband Wayne, National Institute of Health, E.U.A.).

### **Imunocitoquímica**

A marcação imunocitoquímica foi realizada após as células cultivadas e tratadas em placa de 24 poços terem sido fixadas com metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS e em seguida, incubadas por 1 hora com os anticorpos primários anti-MMP-2 produzido em coelho (Santa Cruz), na diluição 1:500 em PBS-T, sob leve agitação. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS (3X de 200 $\mu\text{L}$ ) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen corporation), diluído 1:5000 em PBS-T, sob agitação lenta, por 1h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA, DAPI (5 $\mu\text{g/ml}$ ), durante 10 minutos à temperatura ambiente e, o citoplasma corado com o corante Evans Blue (10mg/mL – Fluka) por cerca de 10 minutos. As células foram então lavadas com PBS (3x 200 $\mu\text{l}$ ), analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX70) e fotografadas com filme Kodak Cromo ISO100 em câmera Olympus AX-70.

### **Zimografia**

A determinação da atividade das gelatinases (MMP-9 e MMP-2), secretadas pelas células de glioblastoma, e de suas pro-enzimas, foi analisada por zimografia

(Planchenault et al., 2001; Vincent et al., 2001) dos meios de cultura condicionados livre de soro. Para isto, após plaqueamento celular e tratamento com os flavonóides, o meio de cultura foi coletado e teve sua concentração protéica determinada pelo método colorimétrico de Lowry (1951). Foram aplicados 30µg de proteína por poço em gel de poliacrilamida a 8% (SDS-PAGE) contendo 1mg/mL de gelatina. A corrida foi feita por 60 minutos a 200V. Após a corrida, o gel foi lavado 3 vezes de 10 minutos em solução de Triton 2,5% a 37°C, sob leve agitação. Em seguida, o gel foi incubado em tampão de reativação enzimático (0,2M NaCl + 10mM CaCl<sub>2</sub> + 0,05M Tris-HCl pH 7,5) por 18 horas a 37°C, em recipiente fechado. Os géis foram corados com 0,5% *Coomassie brilliant blue* R-250 (Sigma) por 30 minutos, sob fraca agitação. Em seguida, os géis foram descorados com solução 50% metanol + 10% ácido acético glacial, sob fraca agitação, trocando a solução descorante a cada 15 minutos, até surgir o aparecimento das bandas (zonas de degradação da gelatina). Os géis foram escaneados (ScanJet 4C - HP), e a quantificação da densidade das bandas foi obtida usando o software ImageJ 1.33u (Rasband Wayne, National Institute of Health, E.U.A.). A análise densitométrica foi realizada em três experimentos independentes.

## **2.7. Análise da migração celular**

### **Ensaio de lesão em monocamada de células**

A avaliação do potencial dos flavonóides em inibir a migração das células GL-15 foi investigada através do ensaio de simples lesão em monocamada celular. As células foram cultivadas nas placas de 6 poços, previamente preparadas com os suportes de MEC, até atingirem a confluência. Após formação de uma monocamada celular confluyente, foi promovida uma lesão uniforme nesta monocamada celular, de forma cuidadosa para não ferir os suportes de MEC, usando uma ponteira de 200µL e, em seguida lavada a monocamada com PBS estéril, para retirar as células desprendidas durante a lesão. Após a lavagem, a monocamada foi tratada com os flavonóides em estudo, diluídos em meio de cultura DMEM livre de soro fetal bovino (SFB), durante cerca de 48 horas. As células foram fotografadas nos intervalos de

tempo 0, 12, 24 e 48 horas, durante o tratamento, para avaliar a redução na espessura das áreas de lesão.

## **2.8. Análise da expressão de conexina 43 (CX43)**

### **Imunocitoquímica**

O efeito dos flavonóides na expressão de CX43 foi avaliado através de marcação imunocitoquímica. Após cultivo e tratamento das células em placas de 24 poços, as mesmas foram fixadas com metanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O excesso de metanol foi desprezado e as placas ficaram em repouso, abertas, até completa evaporação e secagem do metanol. A seguir as células foram reidratadas com PBS e em seguida, incubadas por 1 hora com os anticorpos primários anti-conexina 43 produzido em coelho (Santa Cruz), na diluição 1:800 em PBS-T, sob fraca agitação. Decorrido o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS (3X de 200 $\mu\text{L}$ ) e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen corporation), diluído 1:5000 em PBS-T, sob agitação lenta, por 1h à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, os núcleos das células foram corados com o agente intercalante de DNA, DAPI (5 $\mu\text{g/ml}$ ), durante 10 minutos à temperatura ambiente e, o citoplasma corado com o corante Evans Blue (10mg/mL – Fluka) por cerca de 10 minutos. As células foram então lavadas com PBS (3x 200 $\mu\text{l}$ ), analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus BX70) e fotografadas com filme Kodak Cromo ISO100 em câmera Olympus AX-70.

## **2.9. Investigação de modificações ultraestruturais em células GL-15**

### **Microscopia eletrônica de transmissão (MET).**

As alterações ultraestruturais nas células de glioblastoma GL-15 tratadas com flavonóides foram investigadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET). As células GL-15 foram cultivadas em garrafas de cultura de 50mL até formarem monocamadas confluentes. Após atingirem a confluência, a monocamada

foi tratada com os flavonóides em estudo, previamente diluídos e meio DMEM livre de soro fetal bovino (SFB), durante 48 horas. Em seguida o meio de cultura foi descartado e o tapete celular foi fixado com solução fixadora (Glutaraldeído 2,0%; paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4) a TA, durante cerca de 2 horas. Após este período, as amostras fixadas foram raspadas da garrafa e transferidas para tubos *ependorf*, centrifugadas a 4.000 RPM por 5 minutos, descartado o sobrenadante e, em seguida lavadas (3x) com tampão cacodilato de sódio 0,1M em intervalos de 5 minutos para cada centrifugação (lavagem), também a 4.000 RPM. O material foi então desidratado a TA em banhos (1x) com acetona nas concentrações 30, 50, 70 e 90%, em intervalos de 10 minutos para cada concentração e, 3 banhos com acetona 100% também em intervalos de 10 minutos. Após a desidratação, o material passou pela etapa de substituição em acetona 100% + resina Epóxi (1:1, v/v) durante 24 horas, para em seguida ser incluído em resina Epóxi 100% (Polybed).

Os cortes histológicos foram feitos em ultramicrótomo Leica (Alemanha) com navalha de diamante, colhidos em “grid” de cobre e, em seguida contrastados pelo citrato de chumbo e acetato de uranila. O material foi então analisado e documentado em microscópio eletrônico de transmissão da marca Zeiss, no Laboratório de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CPqGM / Fiocruz, Salvador - Bahia.

### **3. Análise estatística dos resultados**

Cada variável experimental foi analisada em quadruplicada e em três experimentos independentes e os resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. Nos casos em que os grupos apresentaram distribuição normal a análise dos resultados foi feita usando o teste *ANOVA One Way* seguido do teste *Student-Newmann-Keuls*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significantes.

### **4. RESULTADOS**

#### **4.1. Efeito citotóxico dos flavonóides sobre as células GL-15**

A citotoxicidade dos flavonóides sobre as células GL-15 foi determinada através do ensaio do MTT que determina a citotoxicidade através da medida da função das desidrogenases mitocondriais. Quando comparado ao controle (DMSO 0,1%) foi observado que os flavonóides F12 (kaempferol), F7 (quercetina) e rutina na concentração testada de 50  $\mu$ M, não revelaram toxicidade para células GL-15 após 48 horas de tratamento. Por outro lado, os flavonóides F11 (crisina), F2 (apigenina) e F32 (3',4'-dihydroxiflavona) mostraram significativa citotoxicidade ( $p < 0.05$ ) para as células GL-15 (Fig. 1).

#### **4.2. Efeito dos flavonóides sobre a viabilidade das células GL-15**

O efeito dos flavonóides na viabilidade de células de glioblastoma humano da linhagem GL-15, após 48 horas de tratamento, foi investigado através da coloração com o corante azul de tripan (Fig. 2). Neste ensaio de viabilidade, mostrou-se que houve uma redução significativa ( $p < 0.05$ ) no número de células viáveis da linhagem GL-15, após 48 horas de exposição a uma concentração de 50  $\mu$ M para os tratamentos com os flavonóides crisina (F11); 3',4'-dihydroxiflavona (F2); apigenina (F32); kaempferol (F12) e rutina.

#### **4.3. Efeito dos flavonóides na morfologia e estrutura de células GL-15**

Alterações morfológicas e estruturais provocados nas células GL-15, após tratamento com os flavonóides, foram analisadas em microscopia por contraste de fase assim como por imunocitoquímica para a proteína ácida glial fibrilar GFAP, buscando desvendar o potencial morfogênico destes compostos. As células GL-15 em condições de controle (DMSO 0,1%) formam uma monocamada de células de fenótipo bipolar, com volume do corpo celular pouco aumentado e células de tamanhos variados. No entanto, os flavonóides avaliados mostraram ser morfogênicos em células GL-15. Notou-se que as células tratadas apresentaram-se



mais alongadas, emitindo finos processos citoplasmáticos com evidente retração citoplasmática (Fig. 3A – setas escuras). Uma diminuição na celularidade foi também evidenciada após tratamento com os flavonóides, especialmente com o flavonóide rutina.

A imunodeteção para GFAP demonstrou uma marcação heterogênea da proteína, restrita a uma pequena população de células GL-15 em condições controle (DMSO 0,1%). Nas culturas tratadas com os flavonóides foi possível observar algumas células marcadas para GFAP, destacando os tratamentos com apigenina, quercetina e rutina, nos quais a distribuição da marcação foi bem evidente em toda a extensão dos finos prolongamentos citoplasmáticos emitidos por células GL-15 (Fig. 3B).

A microscopia eletrônica de varredura das células GL-15 na condição controle (DMSO 0,1%), demonstrou heterogeneidade na forma celular e nos prolongamentos citoplasmáticos, incluindo a presença de filopódias extensas (Fig. 4A e 4B). Foram observadas células apresentando projeções citoplasmáticas extensas, como ilustrado na figura 4A. Nestas projeções, é possível observar a presença de numerosas filopódias na superfície celular. Na figura 4C, os filopódias se concentram na extremidade da projeção citoplasmática da célula. Nas células tratadas com flavonóides, foi evidente a presença de células bipolares com citoplasma retraído (Fig. 4D) e finas e longas extensões citoplasmáticas apresentando heterogeneidade quanto à presença de filopódias (Fig. 4E). No tratamento com rutina, por exemplo, foi possível observar células bipolares com aspecto tipo glia-radial, emitindo extensos prolongamentos citoplasmáticos com escassos filopódios na superfície (Fig. 4F), quando comparado ao controle (DMSO 0,1%). Aspecto semelhante foi observado para os demais flavonóides.

#### **4.4. Investigação do potencial anti-invasão de flavonóides**

Visando determinar o potencial anti-invasivo de flavonóides em células de glioblastoma, inicialmente buscamos determinar a migração de células em ensaios de simples lesão em monocamadas de células GL-15. Observamos que os flavonóides induziram um retardo na migração de células GL-15 para a zona de lesão, principalmente durante as primeiras 12 horas após tratamento (Fig. 5),

quando comparado a condição controle (DMSO 0,1%). Percebeu-se também um acúmulo de células aparentemente se desprendendo do tapete celular após tratamento com o flavonóide rutina.

Para determinar o potencial anti-invasivo dos flavonóides usados, realizamos também análise da expressão de componentes de MEC, bem como a expressão e atividade de MMPs. A imunomarcação para as proteínas da MEC, laminina e fibronectina, foi realizada no meio extracelular e no compartimento citoplasmático. Em condições controle, as células GL-15 expressaram fracamente fibronectina e laminina, tanto a nível extracelular quanto a nível intracelular (Fig. 6 e 7, respectivamente). Após tratamento com os flavonóides, foi observado um aumento na marcação de fibronectina extracelular, a qual foi bem mais evidente nas culturas tratadas com F32 (apigenina) (Fig. 6). Este aumento da expressão de fibronectina induzido pelos flavonóides foi também evidenciado através de marcação da proteína nos compartimentos intra e extracelular (Fig. 7), indicando que todos os flavonóides testados induziram uma regulação positiva na síntese de fibronectina. Quanto à laminina, não foi evidenciado marcação no controle (DMSO 0,1%) e nem nos tratamentos. No entanto, a análise da expressão da laminina após fixação revelou que os flavonóides induziram a síntese da proteína, evidenciada especialmente na região perinuclear (Fig. 7). A expressão das proteínas de MEC foram também avaliadas através da técnica do *western blot*. Em condições controle foi observada uma fraca expressão de fibronectina, a qual foi induzida nas culturas tratadas com os flavonóides F12, F32 e especialmente com a rutina. A expressão de laminina através desta técnica somente foi evidenciada nas culturas tratadas com rutina (Fig. 8).

As MMPs são expressas e secretadas como precursores inativos que são ativados pela remoção de um pro-peptídeo N-terminal. As formas latente e ativa das enzimas podem ser diferenciadas em função de seus pesos moleculares (PM). A expressão de MMP-2 foi avaliada através de *western blot* e imunocitoquímica. A expressão de MMP-2 (Fig. 9) foi claramente evidenciada em culturas em condição controle (DMSO a 0,1%). Por outro lado, as culturas de células tratadas com 3',4'-dihidroflavona (F2) mostraram uma fraca marcação, a qual foi pouco evidente para os demais tratamentos. A análise da expressão MMPs através *western blot* também

revelou uma redução na expressão de MMP2 (63kDa), em menor nível após tratamento com F2, corroborando com os achados da análise imunocitoquímica (Fig. 10).

A avaliação da atividade das gelatinases através da zimografia revelou uma redução na atividade das metaloproteinases, após 24 horas de tratamento com os flavonóides testados. Entretanto, as células tratadas com os flavonóides 3',4'-dihidroxi-flavona, crisina, kaempferol e quercetina, apresentaram uma redução mais expressiva das gelatinases (Fig. 11).

Para estudar se os flavonóides testados aqui exibiam algum efeito na regulação da comunicação intercelular, outro fator associado à migração e invasão de células tumorais, investigamos a expressão da proteína conexina 43 (CX43), presente em junções comunicantes de importantes grupos celulares cerebrais. Foi observada uma evidente marcação para CX43 em todos os tratamentos e na condição controle (DMSO a 0,1%). A marcação mostrou-se bem distribuída nos prolongamentos citoplasmáticos das células GL-15, principalmente nas extremidades destes prolongamentos (Fig. 12). Uma redução na expressão de CX43 somente pode ser percebida nas culturas tratadas com rutina.

#### **4.5. Efeito dos flavonóides na ultraestrutura de células GL-15**

A análise de imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou que em condições controle (Fig. 13-1), as células GL-15 apresentavam um citoplasma denso, com núcleos de tamanhos e formas variados e nucléolos proeminentes (Fig.13-1A), com citoplasma apresentando extensões tipo filopódias (Fig.13-1B). As mitocôndrias visualizadas apresentavam formas e tamanhos variados, às vezes com aspecto intumescido e desarranjos nas cristas (Fig.13-1D). O retículo endoplasmático e o complexo de Golgi apresentavam-se sem alterações visíveis (Fig.13-1B, 1C e 1D). As células tratadas com os flavonóides apresentaram algumas alterações ultraestruturais visíveis, como dilatação das cisternas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático rugoso (Fig.13-2A, 2B e 2C), núcleos com aspecto retraído e condensação do material cromatínico (Fig.13-

2A). Observou-se também mitocôndrias eletrodensas com tamanho e forma variados, algumas delas apresentando cristas com aspecto desarranjado (tipo cristólise) (Fig.13-2D), a presença de inúmeras lamelas concêntricas tipo figuras de mielina, estruturas vacuolares no citoplasma (Fig.13-2C), e estruturas na periferia da membrana plasmática semelhantes a *blebs* (brotamento).

## 5. DISCUSSÃO

Em nossos estudos sobre o potencial antitumoral da rutina (SANTOS, et al., 2011), evidenciamos que este flavonóide inibiu a proliferação e a viabilidade de forma dose-dependente de células de glioblastoma da linhagem GL-15, assim como induziu a apoptose, quando tratadas em concentrações de 10 a 100  $\mu\text{M}$ . A linhagem celular GL-15, estabelecida por Bocchini e cols (1991), corresponde a células de glioblastoma multiforme humano altamente proliferativo. Dando continuidade a avaliação do potencial antitumoral de flavonóides, no presente estudo investigamos as propriedades antitumorais de flavonóides polihidroxilados (3',4'-dihydroxiflavona, quercetina, crisina, kaempferol, apigenina e rutina), extraídos de plantas do semi-árido do nordeste brasileiro, em termos de citotoxicidade, viabilidade, alterações morfológicas, ultraestruturais e migração celular, em cultura de células de glioma humano.

Investigamos através do teste do MTT, se os flavonóides em estudo interferem na função mitocondrial das células de glioblastoma da linhagem GL-15. Através desta técnica demonstramos que dentre os flavonóides testados, na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , 3',4'-dihydroxiflavona, apigenina e crisina reduzem a função mitocondrial das células tumorais (Fig. 1). Por outro lado, observamos que os flavonóides kaempferol, rutina e quercetina, não apresentaram efeito significativo no metabolismo das células GL-15. Estes achados mostram que os flavonóides testados são capazes de alterar o metabolismo celular das células de glioblastoma da linhagem GL-15.

O efeito dos flavonóides na viabilidade e proliferação em células de glioma (GL-15) foi estudado após um período de 48 horas de tratamento. A proliferação das células GL-15 foi significativamente reduzida quando as células foram tratadas com

os flavonóides crisina; 3',4'-dihidroxiavona; apigenina; kaempferol e rutina (Fig. 2). Dentre os flavonóides estudados, destacamos os flavonóides 3',4'-dihidroxiavona e rutina, por terem reduzido de forma mais expressiva o número de células viáveis. Por um lado, o flavonóide 3',4'-dihidroxiavona mostrou-se mais citotóxico, reduzindo significativamente o número de células viáveis. Por outro lado, o flavonóide rutina, apesar de não ter demonstrado citotoxicidade significativa, também reduziu o número de células viáveis, após 48 horas de tratamento.

Muitos trabalhos têm mostrado que flavonóides interferem na atividade metabólica de tumores. Scheck et al. (2006), demonstraram em sua pesquisa com o extrato total de *Scutellaria baicalenses*, que flavonóides presentes neste extrato inibiram de forma dose dependente a viabilidade celular em linhagem de glioblastoma multiforme humano, assim como inibiram também o crescimento e induziram apoptose, apontando os flavonóides deste extrato como adjuvantes promissores no tratamento de gliomas malignos. Branganhol et al., (2006) mostraram que o flavonóide quercetina inibiu a proliferação celular em glioblastoma multiforme da linhagem U138MG, causando inibição da viabilidade celular, indução de apoptose e parada do ciclo celular na fase G2.

Dentre os flavonóides utilizados neste estudo, algumas propriedades antitumorais dos flavonóides rutina, quercetina e apigenina têm sido estudadas. Cardenas et al., (2006), divulgaram em pesquisa *in vitro* que o flavonóide apigenina inibiu a proliferação e viabilidade de células de câncer de mama, melanoma, colo uterino e adenocarcinoma. Yang et al., (2000), em estudo realizado *in vivo* com ratos induzidos a desenvolverem displasia intestinal, observaram que após tratamento com dieta rica em rutina e quercetina, houve um aumento no índice de células em apoptose, indicando um possível efeito inibitório na carcinogênese do cólon. Nguyen et al. (2004), observaram que quercetina apresentou um efeito anti-proliferativo e apoptótico em células de câncer de pulmão da linhagem A549, com a apoptose associada a ativação da via MEK-ERK. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado que a inibição da proliferação e a apoptose em células tumorais tratadas com flavonóides estão associadas a uma redução da ativação de ERK. Jeong et al. (2009), mostraram que gliomas tratados com flavonóide kaempferol apresentavam inibição no crescimento por conta e um efeito apoptótico devido a diminuição da ativação de ERK. Santos et al. (2011) mostraram o mesmo efeito em

células de glioblastoma da linhagem GL-15, tratadas com o flavonóide rutina. Assim, observamos que classes diferentes de flavonóides apresentam efeitos similares, com relação ao crescimento e morte celular. Isto vem a reforçar o conhecimento sobre o potencial de flavonóides em regular o crescimento e morte celular, mesmo que por mecanismos de sinalização diferentes. A este fato, enfatizamos a importância de mais estudos de caracterização do efeito de flavonóides nos mecanismos e vias sinalizadoras envolvidas na proliferação dos tumores, em especial dos glioblastomas multiformes humano.

A capacidade dos flavonóides avaliados em induzirem mudanças na morfologia de células da linhagem GL-15 foi avaliada pela microscopia de contraste de fase, imunocitoquímica para GFAP e microscopia eletrônica de varredura. Observamos que todos os flavonóides aqui estudados induziram modificações morfológicas após 48 h de tratamento na concentração de 50  $\mu$ M. As células GL-15 apresentaram, quando expostas aos flavonóides 3',4'-dihidroxi-flavona, crisina, kaempferol, apigenina, quercetina e rutina, contração do corpo celular e aquisição de um fenótipo bipolar com emissão de finos prolongamentos citoplasmáticos, característicos de diferenciação astrogliar. Estas modificações morfológicas nas células GL-15 foram evidenciadas também através da microscopia eletrônica de varredura, onde pudemos observar com mais detalhes as mudanças morfológicas induzidas pelos flavonóides. Na imunomarcação da proteína GFAP, observamos uma expressão heterogênea nas células GL-15, sendo que a expressão foi melhor evidenciada em células que apresentaram uma morfologia mais fusiforme. A GFAP é uma importante proteína dos filamentos intermediários de astrócitos, sendo considerada uma proteína marcadora específica destas células. Alguns trabalhos têm relatado que o aumento na expressão de GFAP está associado a uma diferenciação de gliomas malignos (SANTOS, et al., 2011; RUTKA, et al., 1994; RUTKA, et al., 1996). Isto sugere que gliomas tratados com flavonóides estariam assumindo características estruturais semelhantes ao de células astrocíticas. A análise imunocitoquímica, realizada por Bocchini e colaboradores (1993) com células GL-15, revelou que estas células expressam constitutivamente e de forma homogênea a proteína vimentina, e de forma heterogênea a proteína GFAP. Estes mesmos autores mostraram uma expressão densidade dependente para GFAP em células GL-15. Os nossos resultados demonstraram que os flavonóides avaliados foram capazes de induzir alterações fenotípicas nas células gliomatosas da linhagem

GL-15, alterações estas que sugerem um potencial morfogênico que pode ser investigado através de marcadores das diferentes populações de células do SNC.

Para migrar, as células precisam adquirir caracteristicamente uma morfologia polarizada em resposta a vários sinais extracelulares, com formação de extensões citoplasmáticas tipo lamelipódia e filopódia que são orquestradas pelos filamentos de actina. Na extremidade dos lamelipódios, as células formam adesões que conectam a matriz extracelular ao citoesqueleto de actina, permitindo a ancoragem das extensões citoplasmáticas e conseqüentemente facilitar o arraste do corpo celular (LE CLAINCHE and CARLIER, 2008). Em células tumorais e em células transformadas, as metaloproteases (MMPs) associados ao lamelipódios medeiam a proteólise dos constituintes de MEC, incluindo fibronectina, laminina e colágeno, contribuindo desta forma no processo de migração e invasão celular (SMALL, et al., 2008). Trabalhos recentes têm sugerido que as MMPs têm um papel central na fisiopatologia dos tumores cerebrais e, a expressão destas enzimas parece estar fortemente associada com a agressividade do tumor (WANG et al., 2010; SHEN HUNG et al., 2010).

A invasão de gliomas é um processo que ocorre em várias etapas, em que tumor ao separar-se da lesão primária, estabelece novos contatos com células vizinhas e com a matriz extracelular (MEC), degradando e remodelando a MEC, para poder dispersar-se nos tecidos normais do cérebro (STYLLI, KAYE e LOCK, 2008). Em nosso estudo, investigamos o efeito anti-migratório e anti-invasivo dos flavonóides em células GL-15, através do ensaio de simples lesão em monocamada celular, da análise de expressão e atividade das metaloproteases MMP-2 e MMP-9 e da expressão de componentes de MEC (laminina e fibronectina), bem como o efeito dos flavonóides estudados na regulação da expressão de conexina 43, proteína esta que têm sido associada a capacidade migratória e invasiva de tumores. Analisamos também, através de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, o efeito dos flavonóides quanto a mudanças induzidas na formação de extensões tipo filopódias e lamelipódias, estruturas estas também associadas ao caráter invasivo de tumores.

Nossos resultados mostraram que todos os flavonóides avaliados diminuíram a atividade das gelatinases MMP-2 e MMP-9, quando analisados pelo ensaio zimográfico, com destaque para os flavonóides 3',4'-dihydroxiflavona e kaempferol. Mostramos também que os flavonóides reduziram a expressão de MMP-2 ativa, com destaque para quercetina, kaempferol e rutina, que inibiram significativamente a expressão de MMP-2 ativa. Foi mostrado também que as células GL-15 são muito ágeis na sua capacidade de migração, e que as células tratadas com flavonóides polihidroxilados apresentaram retardo na atividade migratória. Quanto a expressão de conexina 43 (CX43), observamos uma evidente marcação, com distribuição concentrada nos finos prolongamentos celulares emitidos pelas células GL-15. Perfil de distribuição semelhante foi observado na condição controle. Por outro lado, esta marcação foi menos evidente quando as células foram tratadas com rutina. Estes achados sugerem que os flavonóides avaliados apresentam um efeito anti-invasivo e anti-migratório em células da linhagem GL-15, no que diz respeito ao potencial destes compostos em regular a expressão e atividade de MMPs e regular a expressão de CX-43.

Alguns trabalhos têm avaliado a importância de junções comunicantes na migração e invasão de gliomas. LIN, et al., (2002), mostraram que a inibição de CX43 com anticorpos específicos, estava associado a uma diminuição na agregação de astrócitos e de gliomas malignos da linhagem C6, e a conseqüente capacidade invasiva destes gliomas. De outra forma, ZHANG, et al., (2003), observaram *in vitro*, que células de glioma C6 transfectadas com CX43 expressavam altos níveis de MMP, contribuindo para o caráter invasivo desta linhagem, principalmente quando estas células foram co-cultivadas com astrócitos.

A ação de diversos flavonóides na regulação da migração e invasão de gliomas, também tem sido amplamente avaliada. WANG et al., (2010) mostraram que o flavonóide baicaleína inibiu a expressão e a secreção das metaloproteases MMP-2 e MMP-9, bem como suprimiu a adesão ao substrato de fibronectina e a migração em células de carcinomas de cérebro humano da linhagem MDA-MB-231. SHEN HUNG et al., (2010), avaliando o efeito antitumoral do flavonóide acacetina em células de câncer de próstata D-145, também mostraram que o flavonóide poderia inibir a habilidade de migração e invasão destas células pela redução da



expressão de MMP-2 e MMP-9, que estava associada a inibição de fosforilação da proteína p38 MAPK. Em outro trabalho, realizado por LIN et al., (2008), foi mostrado que o flavonóide quercetina apresentava um efeito inibidor para a metaloprotease MMP-9 em células de carcinoma cerebral humano da linhagem MCF-7. Estes autores observaram ainda que este efeito estava associado com a atividade antioxidante da quercetina, sendo esta atividade atribuída aos grupos hidroxilas (OH), localizados em ambos os carbonos C3' e C4', e que um grupo OH adicional, localizado em um dos carbonos C3, C5 ou C7, potencializava o efeito inibidor na expressão de MMP-9 e conseqüente inibição do potencial invasivo de células MCF-7. Em nosso estudo, além da quercetina (3,3',4',5,6-Pentahydroxyflavone) avaliada, os flavonóides 3',4'-dihydroxiflavona, kaempferol, apigenina e rutina também apresentam grupos hidroxilas nos carbonos C3' ou C4', com exceção da crisina, que apresenta grupos OH nos carbonos C5 e C7. A rutina, além de apresentar grupos OH em ambos os carbonos C3' e C4', apresenta também grupos hidroxilas nos carbonos C3 e C5. Os flavonóides que apresentaram grupo OH no carbono C3' ou no carbono C4' ou em ambos, regularam positivamente a expressão de GFAP, e apresentaram efeito regulador na atividade e expressão de MMPs, na expressão de CX-43, bem como no retardo da migração celular. Os flavonóides kaempferol e apigenina, apesar de apresentar OH apenas em um dos carbonos C3' ou C4', mostrou em células GL-15, um expressivo efeito na inibição da expressão de MMP-2 e no retardo da migração celular. Desta forma, nossos resultados corroboram com dados observados em outros estudos com linhagens diferentes de tumores.

A proteína laminina, corresponde a uma família de glicoproteínas envolvidas na manutenção da integridade da arquitetura de membranas basais em diversos tecidos. Este grupo de glicoproteínas participa na formação da estrutura da matriz extracelular (MEC), e interagem com diferentes tipos de células normais ou patológicas, influenciando sua proliferação, diferenciação, adesão e migração, daí sua importância na regulação da migração celular, principalmente em células neoplásicas. A presença de algumas classes de receptores para laminina na membrana da célula são cruciais nesta regulação. Um importante grupo de receptores para laminina são as integrinas, que reconhece e liga-se a um sítio específico em uma das cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$  de lamininas, desencadeando uma série de efeitos celulares (TZU, J. and MARINKOVICH, M.P., 2008). Outra proteína que

também está associada à adesão da célula à MEC, são as fibronectinas. Alguns trabalhos têm mostrado uma forte marcação para as proteínas de MEC, com destaque para laminina e fibronectina, em linhagens celulares de glioblastoma *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que a expressão de componentes de MEC por estas células estariam envolvidos na regulação da invasão e migração de tumores (CHINTALA et al., 1996). PLANCHENAULT et al. (2001), por exemplo, mostraram que células de gliomas da linhagem 8MG e 42MG apresentavam imunoreatividade intracelular e extracelular para fibronectina, enquanto que nas células da linhagem GL-15, a imunoreatividade intracelular era mais pontual para fibronectina, localizada na área perinuclear em um número restrito destas células, não observando imunoreatividade no meio extracelular. Neste mesmo trabalho, os autores mostraram uma marcação pontual para laminina intracelular nas três linhagens celulares. Em nosso trabalho, observamos discreta distribuição de laminina no meio extracelular das células GL-15 e uma expressão citoplasmática mais evidente, principalmente nas células tratadas com 3',4'-dihidroxi-flavona e apigenina. Foi mostrado também marcação para fibronectina no meio extracelular, com destaque para os tratamentos 3',4'-dihidroxi-flavona, quercetina e apigenina, enquanto que no citoplasma, a marcação foi fortemente distribuída em todos os tratamentos com flavonóides. A discreta distribuição de laminina e a marcação para fibronectina observadas no compartimento extracelular, podem estar associadas a uma atividade anti-migração exercida pelos flavonóides. A marcação citoplasmática observada para laminina e fibronectina é sugestiva de regulação por parte dos flavonóides, no mecanismo de migração e adesão de células tumorais. Células de glioma expressam fibronectina e laminina, liberado estas moléculas na MEC, entretanto, gliomas com grau mais invasivo, como é o caso da linhagem GL-15, expressam menos fibronectina quando comparados a gliomas de grau menos invasivo (PLANCHENAULT et al, 2001). A presença de elevados níveis de fibronectina na MEC de gliomas menos invasivos têm sido associados a interações célula-célula entre tumor e célula hospedeira, contribuindo na proliferação e migração celulares (PLANCHENAULT et al, 2001; ROSAVIO et al, 1996). Apesar da laminina compor a membrana basal e contribuir para ancoragem celular, principalmente através da formação de hemidesmossomas, a ligação sítio específica da laminina com moléculas de integrina e o processamento de cadeias de laminina por enzimas específicas tais como MMP2, MT1MMP, plasmina e BMP1, podem desencadear outras respostas celulares, como a indução

da migração e invasão de tumores (TZU & MARINKOVICH 2008). Estudos têm mostrado, por exemplo, que o processamento da cadeia  $\alpha 5$  da laminina 511 está associado ao decréscimo da agregação e aumento no potencial migratório em câncer de próstata (BAIR *et al.*, 2005). Em outro trabalho, foi observado que o processamento da cadeia  $\beta 3$  da laminina 332 facilitava a migração de células do câncer de cólon e próstata (UDAYAKUMAR *et al.*, 2003; REMY *et al.*, 2006). Desta forma, apesar de termos observado um aumento na expressão citoplasmática de fibronectina e laminina em uma linhagem celular altamente invasiva (GL-15), é importante ainda, avaliar quais os mecanismos celulares de sinalização e regulação estariam envolvidos na expressão destas proteínas de MEC nas células GL-15.

A análise por microscopia eletrônica de transmissão mostrou que as células não tratadas com flavonóides apresentavam RER e aparelho de Golgi preservados, heterogeneidade na morfologia nuclear com nucléolos evidentes, estruturas tipo filopodias e mitocôndrias intumescidas e eletrolucentes. Por outro lado, as células tratadas com flavonóides polihidroxilados mostraram evidências de alterações ultraestruturais, indicativas de um possível efeito apoptótico causado pelos flavonóides estudados neste trabalho. Dentre estas alterações, observamos expressiva dilatação no RER e complexo de Golgi, núcleos retraídos e mitocôndrias mais eletrodensas de tamanhos variados, com algumas mostrando desarranjo na estrutura das cristas e presença de figuras de mielina. RUTKA *et al.*, (1986), mostraram inicialmente, em um estudo de caracterização de uma linhagem de células de gliosarcoma humano (SF-539 BT), que as células deste tumor apresentavam extensões citoplasmáticas semelhante a filopódias, núcleo central com nucléolo proeminente e RER e aparelho de Golgi proeminentes. ALONSO *et al.* (2003), observaram em células de glioma da linhagem A-172, a presença de morfologia irregular, com núcleos volumosos e irregulares, projeções microvilosas na superfície da célula, mitocôndrias e RER preservados. Por outro lado, estes mesmos autores observaram que algumas células de glioma ao serem tratadas com flavopiridol (uma flavona sintética), mostraram condensação do material cromatínico com núcleos colapsados e fragmentados, vacuolização no citoplasma como possíveis dilatações do retículo endoplasmático e mitocôndrias sem alterações ultraestruturais visíveis, como possível atividade apoptótica induzida pela flavona. Em análises ultraestruturais, a presença de mitocôndrias intumescidas com

desarranjos nas cristas e cristólise parcial ou total, são achados comuns em células de glioma (MORILLO et al., 2010). Em nosso trabalho, observamos em células GL-15 não tratadas com flavonóides a presença de mitocôndrias esféricas, intumescidas e eletrolucentes, entretanto, não visualizamos cristólise evidente. Por outro lado, as células tratadas com alguns flavonóides mostraram a presença de mitocôndrias eletrodensas, de tamanhos variados e algumas apresentando cristas desarranjadas com aspecto de cristólise. Uma vez que as enzimas envolvidas na fosforilação oxidativa estão localizadas na membrana interna mitocondrial, a área de superfície da mitocôndria e o número de cristas são geralmente associados ao grau de atividade metabólica exibida pela célula (MODICA-NAPOLITANO & SINGH, 2002). Desta forma, alterações envolvendo o tamanho mitocondrial bem como a integridade de suas cristas poderão repercutir em alterações no metabolismo celular. Segundo MORILLO et al. (2010), em células de astrocitomas, por exemplo, a presença de mitocôndrias íntegras e eletrodensas podem produzir energia por fosforilação oxidativa, enquanto que mitocôndrias eletrolucentes que apresentam desorganização das cristas e cristólise parcial ou total, são incapazes de gerar energia por fosforilação oxidativa. Em nossos achados, observamos que nos tratamentos com quercetina e kaempferol, as mitocôndrias mostravam aspecto mais eletrodenso. Os dados do MTT para estes mesmos flavonóides mostraram percentuais elevados, se comparado aos demais flavonóides. Estes dados nos permitem sugerir um possível efeito de quercetina e kaempferol no aumento da atividade metabólica de células da linhagem GL-15, ainda que sua viabilidade esteja comprometida. A presença de lamelas concêntricas, tipo figuras de mielina e estruturas na periferia da membrana plasmática semelhantes a *blebs*, também foram visualizadas nas células tratadas com estes e demais flavonóides. Segundo ADRAIN & MARTIN (2001), a presença de *blebs* na membrana plasmática, bem como a retração celular, a compactação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos são características fenotípicas de células que morrem por apoptose, sob regulação das cisteína-proteases (caspases). PAVON et al. (2010), em estudo ultraestrutural feito com células de glioma, relataram também que a intensa vacuolização citoplasmática, a desintegração da membrana plasmática e a presença de figuras de mielina, são indicadores ultraestruturais sugestivos de morte celular.

O microambiente tumoral possui em sua constituição inúmeras moléculas da matriz extracelular. Para migrar, as células de glioma precisam modificar a sua forma e interagir com o microambiente. A atividade dos filamentos de actina na membrana plasmática gera estruturas conhecidas como lamelipódias e protrusões digitiformes conhecidas como filopódias, que são considerados processos essenciais na migração celular, principalmente de tumores. Os filopódias funcionam como sensores do microambiente externo, e como extensões da membrana plasmática que irão realizar o contato inicial com a matriz extracelular (CLAINCHE & CARLIER, 2008; HWANG, SMITH, SALHIA & RUTKA, 2008). Observamos em nosso trabalho, através de microscopia eletrônica de varredura, que flavonóides polihidroxilados reduzem notadamente o número de filopódias na superfície das extensões citoplasmáticas emitidas pelas células GL-15. Em concordância com estes resultados, observamos também pelo ensaio de migração, um evidente retardo na migração destas células, durante as primeiras 12 horas de tratamento. Estes dados nos levam a sugerir um importante efeito anti-migratório e anti-invasivo destes flavonóides, em células de glioma da linhagem GL-15. Este é um achado importante, com relação aos flavonóides estudados, levando em consideração que o potencial invasivo dos gliomas é uma das características que contribuem para a ineficácia dos tratamentos convencionais. Alguns trabalhos têm mostrado *in vitro*, que a redução no número de filopódias e alterações em lamelipódias, em células de gliomas invasivos, estão associados a diminuição da capacidade migratória e invasiva do tumor (HWANG, SMITH, SALHIA & RUTKA, 2008; CORRÊA et al, 2010; LEE, et al., 2006). Em estudo com células de hepatoma humano, foi mostrado, por exemplo, o potencial do flavonóide luteolina (3',4',5',7'-tetrahidroxiflavona) em inibir a formação de lamelipódias e filopódias, com conseqüente redução do potencial migratório e invasivo das células (LEE, et al., 2006). E nosso estudo, observamos que dentre os flavonóides estudados, o 3'4'-dihidroxiflavona e o kaempferol (3,4',5,7-tetrahidroxiflavone) mostraram uma expressiva redução de filopódias na superfície celular. Isto nos leva a sugerir, mais uma vez, uma possível associação da presença de grupos hidroxilas nos carbonos C3' e C4' com o efeito antitumoral de flavonóides polihidroxilados. Entretanto, mais estudos são necessários para caracterizar de forma mais específica, os mecanismos moleculares envolvidos neste processo.

Em conclusão, nossos resultados mostraram que flavonóides polihidroxilados, apresentaram capacidade de induzir diferenciação e inibir a atividade migratória e invasiva em culturas de células de glioblastoma multiforme humano, bem como induzirem modificações ultraestruturais indicativas de morte por apoptose. Estes resultados sugerem que estes compostos fenólicos podem ser considerados possíveis candidatos como adjuvantes para o tratamento de gliomas malignos, entretanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a ação destes flavonóides nos mecanismos envolvidos com a invasividade de gliomas.

## 6. Referências

1. Adrain, C. and S. J. Martin (2001). "The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas." *Trends in Biochemical Sciences* 26(6): 390-397.
2. Aloisi F (2001) Immune function of microglia. *Glia*; 36:165–179.
3. Alonso, M., C. Tamasdan, et al. (2003). "Flavopiridol Induces Apoptosis in Glioma Cell Lines Independent of Retinoblastoma and p53 Tumor Suppressor Pathway Alterations by a Caspase-independent Pathway1." *Molecular Cancer Therapeutics* 2(2): 139-150.
4. Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629–634
5. Arcuri, C., M. Tardy, et al. (1995). "Glutamine synthetase gene expression in a glioblastoma cell-line of clonal origin: regulation by dexamethasone and dibutyryl cyclic AMP." *Neurochem Res* 20(10): 1133-9.
6. ASCHNER M (1998) Astrocytes as Mediators of Immune and Inflammatory Responses in the CNS. *Neurotoxicology*; 19 (2):269-81.
7. Aschner, M. (1998). "Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes." *Toxicol Lett* 102-103: 283-7.
8. Auld, D. S. and R. Robitaille (2003). "Glial Cells and Neurotransmission: An Inclusive View of Synaptic Function." *Neuron* 40(2): 389-400.

9. Beier, D., P. Hau, et al. (2007). "CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles." *Cancer Res* 67(9): 4010-5.
10. Bilzer, T., D. Stavrou, et al. (1991). "Antigen variation in a human glioblastoma: from the primary tumor to the second recurrence, permanent cell line and xenotransplantation tumors." *Anticancer Res* 11(2): 547-53.
11. Bilzer, T., D. Stavrou, et al. (1991). "Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418(4): 281-93.
12. Bocchini V, Casalone R, Collini, P, Rebel, G, Curto LF (1991) Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res* 265(1):73-81.
13. Bocchini, V., T. Beccari, et al. (1993). "Glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA exhibit mosaic expression in a glioblastoma multiform cell line of clonal origin." *International Journal of Developmental Neuroscience* 11(4): 485-492.
14. Burger PC, Vogel FS, Green SB, and Strike TA (1985). Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56 (5), 1106–1111.
15. Burrows, T. D., A. King, et al. (1993). "Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin." *Hum Reprod* 8(3): 475-84.
16. Chambaut-Guerin, A. M., S. L. Costa, et al. (2000). "Effects of retinoic acid and tumor necrosis factor alpha on GL-15 glioblastoma cells." *Neuroreport* 11(2): 389-93.
17. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC et al (2005) Thrombospondins are astrocyte secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421–433
18. Clement, A. M., S. Nadanaka, et al. (1998). "The DSD-1 carbohydrate epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth." *J Biol Chem* 273(43): 28444-53.
19. Cookson MR, Pentreath VW (1994). Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxic In vitro* 8 (3):351-9.
20. Cookson, B. T., S. Engelhardt, et al. (1994). "Organization of the human annexin V (ANX5) gene." *Genomics* 20(3): 463-7.

21. Cookson, M. S. and M. F. Sarosdy (1994). "Hormonal therapy for metastatic prostate cancer: issues of timing and total androgen ablation." *South Med J* 87(1): 1-6.
22. Costa SL, Paillaud E, Fages C, Rochette-Egly C, Jouault H, Perzelova A, Tardy M (2001) Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eu. J Cancer* 37:520-530.
23. Costa SL, Planchenault T, Charrière-Bertrand C, Mouchel Y, Fages C, Juliano S, et al. (2002). Astroglial Permissivity for Neurotic Outgrowth in Neuron-Astrocyte CoCultures Depends on Regulation of Laminin Bioavailability. *Glia* 37:105-13.
24. Costa SL, Riche D, Fages C, Rochette-Egly C, Tardy M (2002) Efeitos in vitro do ácido retinóico em células de glioblastoma. *Revista Ciências Médicas e Biológicas* 1:49-60.
25. Costa, S. L., E. Paillaud, et al. (2001). "Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation." *Eur J Cancer* 37(4): 520-30.
26. Costa, S., T. Planchenault, et al. (2002). "Astroglial permissivity for neuritic outgrowth in neuron-astrocyte cocultures depends on regulation of laminin bioavailability." *Glia* 37(2): 105-13.
27. Cotran, R.S.; Kumar, V.; Collins, T. (2000). *Patologia Estrutural e Funcional Robbins*. 6ª edição. Guanabara Koogan. 233-1201.
28. Daumas-Duport, C., B. Scheithauer, et al. (1988). "Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method." *Cancer* 62(10): 2152-65.
29. Daumas-Duport, C., B. W. Scheithauer, et al. (1988). "Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases." *Neurosurgery* 23(5): 545-56.
30. Davies, D. L., I. R. Niesman, et al. (2000). "Heterogeneity of astroglia cultured from adult human temporal lobe." *Int J Dev Neurosci* 18(2-3): 151-60.
31. Defer, G. L., H. Adle-Biassette, et al. (1997). "All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications." *J Neurooncol* 34(2): 169-77.
32. Demuth Tand Berens ME (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 70 (2), 217–228.
33. Deshane, J., C. C. Garner, et al. (2003). "Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2." *J Biol Chem* 278(6): 4135-44.



34. Dickson DW, Lee, SC, Mattiace LA; Yen SH, Brosnan C (1993). Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7(1):75–83.
35. Eddleston M, & Mucke L (1993). Molecular profile of reactive astrocytes: implication for their role in neurological disease. *Neuroscience* 54(1):15-36.
36. Elias, P. M. & Friend, D.S. (1976). Vitamin-A-induced mucous metaplasia. An in vitro system for modulating tight and gap junction differentiation. *J Cell Biol.*68:173-188;
37. Flugel A, Labeur MS, Grasbon-FrodL EM, Kreutzberg GW, Graeber MB. Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int J Dev Neurosci* 1999; 17: 547–56.
38. Frankfurt, M., J. O'Callaghan, et al. (1991). "5,7-Dihydroxytryptamine injections increase glial fibrillary acidic protein in the hypothalamus of adult rats." *Brain Res* 549(1): 138-40.
39. Freitas, S., S. Costa, et al. (2010). "Flavonoids inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells." *Phytotherapy Research* 25(6): 916-921.
40. Gao, C., K. Furge, et al. (2007). "Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21): 8995-9000.
41. Garwood, J., O. Schnadelbach, et al. (1999). "DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage." *J Neurosci* 19(10): 3888-99.
42. Giulian, D., J. Li, et al. (1994). "Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture." *Neurochem Int* 25(3): 227-33.
43. Goffman TE, Dachowski LJ, Bobo H, Oldfield EH, Steinberg SM, Cook J, Mitchell JB, Katz D, Smith R, and Glatstein E (1992). Long-term followup on National Cancer Institute Phase I/II study of glioblastoma multiforme treated with iododeoxyuridine and hyperfractionated irradiation. *J Clin Oncol* 10 (2), 264–268.
44. Gomes FC, de Sampaio e Spohr TC, Martinez R, Moura-Neto, V (2001) Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz J Med Biol Res* 34:611–620
45. Gomes, F. C., D. Paulin, et al. (1999). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation." *Braz J Med Biol Res* 32(5): 619-31.
46. Haas, T. L. and J. A. Madri (1999). "Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* 9(3-4): 70-7.

47. Hamada, J., Nagayasu, H., Kawano, T., Mizutani, T., Nakata, D., Hosokawa, M. & Takeichi, N. (1998). Characterization of the progressive sublines derived from a weakly malignant cloned cell line, ER-1, co-inoculated subcutaneously with a foreign body. *Clin. Exp. Metastasis*. 16: 291-8.
48. Havsteen, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." *Pharmacol Ther* 96(2-3): 67-202.
49. Hidalgo, M., A. S. Pierson, et al. (2001). "Therapeutic angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer." *Adv Intern Med* 47: 159-90.
50. Hildebrand, J.; Dewitte, O.; Dietrich, P.Y.; Tribolet, N. (1997). Management of malignant brain tumours. *Eur. Neurol* 38(3):238-253.
51. Hoa, N., L. Ge, et al. "Glioma Cells Display Complex Cell Surface Topographies That Resist the Actions of Cytolytic Effector Lymphocytes." *The Journal of Immunology* 185(8): 4793-4803.
52. Hossain, M. Z., L. R. Wilkens, et al. (1989). "Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation." *Carcinogenesis* 10(9): 1743-8.
53. Hsu, M., T. Andl, et al. (2000). "Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression." *J Cell Sci* 113 ( Pt 9): 1535-42.
54. Huettner C, Czub S, Kerkau S, Roggendorf W, Tonn J-C (1997) Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer research* 17(5A):3217-3224.
55. Ito, S., T. Fukusato, et al. (2002). "Coexpression of glucose transporter 1 and matrix metalloproteinase-2 in human cancers." *J Natl Cancer Inst* 94(14): 1080-91.
56. Kaczmarek, E., S. Zapf, et al. (1999). "Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype." *International Journal of Developmental Neuroscience* 17(5-6): 625-641.
57. Kallmann, B. A., S. Wagner, et al. (2002). "Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells." *FASEB J* 16(6): 589-91.
58. Kandel ER. Nerve cells and behavior. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*. 4<sup>th</sup> ed. New York; 2000.
59. Kandel, E. R. and L. R. Squire (2000). "Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind." *Science* 290(5494): 1113-20.
60. Kim, E., C. Choi, et al. (2008). "Underlying Mechanism of Quercetin-induced Cell Death in Human Glioma Cells." *Neurochemical Research* 33(6): 971-979.

61. Kim, H., Y. S. Kim, et al. (2001). "The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production." *Neurosci Lett* 309(1): 67-71.
62. Kim, S., J. H. Choi, et al. (2009). "Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression and VEGF secretion by inactivation of the Raf/MEK/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cells." *Phytomedicine* 16(6-7): 573-80.
63. King, T. J. and J. S. Bertram (2005). "Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy." *Biochim Biophys Acta* 1719(1-2): 146-60.
64. King, T. J. and P. D. Lampe (2005). "Altered tumor biology and tumorigenesis in irradiated and chemical carcinogen-treated single and combined connexin32/p27Kip1-deficient mice." *Cell Commun Adhes* 12(5-6): 293-305.
65. King, T. J. and P. D. Lampe (2005). "Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues." *Biochim Biophys Acta* 1719(1-2): 24-35.
66. King, T. J., K. E. Gurley, et al. (2005). "Deficiency in the gap junction protein connexin32 alters p27Kip1 tumor suppression and MAPK activation in a tissue-specific manner." *Oncogene* 24(10): 1718-26.
67. Kitadai, Y., K. Haruma, et al. (2000). "Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8." *Clin Cancer Res* 6(7): 2735-40.
68. Kleihues P., Burger, PC, Schneider BW (1993) The new WHO classification of brain-tumors. *Brain Pathology* 3(3):255-268.
69. Kondraganti, S., S. Mohanam, et al. (2000). "Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion." *Cancer Res* 60(24): 6851-5.
70. Kosmehl, H., A. Berndt, et al. (1995). "Differential expression of fibronectin splice variants, oncofetal glycosylated fibronectin and laminin isoforms in nodular palmar fibromatosis." *Pathol Res Pract* 191(11): 1105-13.
71. Koul, D., R. Parthasarathy, et al. (2001). "Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN." *Oncogene* 20(46): 6669-78.
72. Koulakoff, A., W. Meme, et al. (2003). "Neurons and brain macrophages regulate connexin expression in cultured astrocytes." *Cell Commun Adhes* 10(4-6): 407-11.
73. Lal, P. G., R. S. Ghirnikar, et al. (1996). "Astrocyte-astrocytoma cell line interactions in culture." *J Neurosci Res* 44(3): 216-22.

74. Lampert, K., U. Machein, et al. (1998). "Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors." *Am J Pathol* 153(2): 429-37.
75. Lefrancois, T., C. Fages, et al. (1997). "Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures." *J Neurosci* 17(11): 4121-8.
76. Lent, R. (2005). *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências*. Ed. Atheneu. São Paulo. Pag 89-94.
77. Li, A., S. Dubey, et al. (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis." *J Immunol* 170(6): 3369-76.
78. LI, G. & HERLYN, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today*. 6: 163-169;
79. Lin, C.-W., W.-C. Hou, et al. (2008). "Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC $\beta$ /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells." *Carcinogenesis* 29(9): 1807-1815.
80. Luca, M., S. Huang, et al. (1997). "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis." *Am J Pathol* 151(4): 1105-13.
81. Ma, W., T. Tavakoli, et al. (2008). "Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells." *BMC Dev Biol* 8: 90.
82. Martins Rde, P., C. Braga Hde, et al. (2009). "Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice." *Food Chem Toxicol* 47(3): 645-9.
83. Mc Graw, J., G. W. Hiebert, et al. (2001). "Modulating astrogliosis after neurotrauma." *J Neurosci Res* 63(2): 109-15.
84. McCombe, P. A., J. de Jersey, et al. (1994). "Inflammatory cells, microglia and MHC class II antigen-positive cells in the spinal cord of Lewis rats with acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 51(2): 153-67.
85. Mcdonough, W. S., Johansson, A., Joffee, H., Giese, a. & Berens, M. E. (1999). Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17: 601-11.
86. McGraw, J., G. W. Hiebert, et al. (2001). "Modulating astrogliosis after neurotrauma." *J Neurosci Res* 63(2): 109-15.

87. Mead, C. and V. W. Pentreath (1998). "Evaluation of toxicity indicators in rat primary astrocytes, C6 glioma and human 1321N1 astrocytoma cells: can gliotoxicity be distinguished from cytotoxicity?" *Arch Toxicol* 72(6): 372-80.
88. Mercer LD, Kelly BL, Horne MK, Beart PM (2005) Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol.* 69(2):339-45.
89. Middleton, E., C. Kandaswami, et al. (2000). "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer." *Pharmacological Reviews* 52(4): 673-751.
90. Modica-Napolitano, J. S. and K. Singh (2002). "Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 4(09): 1-19.
91. Mokuno, K., J. Kamholz, et al. (1989). "Neuronal modulation of Schwann cell glial fibrillary acidic protein (GFAP)." *J Neurosci Res* 23(4): 396-405.
92. Montgomery, D. L. (1994). "Astrocytes: form, functions, and roles in disease." *Vet Pathol* 31(2): 145-67.
93. Nadarajah, B. (2003). "Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex." *Glia* 43(1): 33-6.
94. Nair, H. K., K. V. K. Rao, et al. (2004). "Inhibition of Prostate Cancer Cell Colony Formation by the Flavonoid Quercetin Correlates with Modulation of Specific Regulatory Genes." *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11(1): 63-69.
95. Nakada, M., H. Nakamura, et al. (1999). "Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors." *Am J Pathol* 154(2): 417-28.
96. Nakada, M.; nakada, S.; demuth, T.; Tran, N. L.; Hoelzinger, D. B.; Berens, M. E. (2007). Molecular targets of glioma invasion Review. *Cell. Mol. Life Sci.* (64): 458 – 478.
97. Naus, C. C. G. & Bani-yaghoub, M. (1998). Gap junctional communication in the developing central nervous system. *Cell Biol. Int.* 22: 751-763;
98. Naus, C. C. G., Elisevich, K., Zhu, D., Belliveau, D. J. & Del Maestro, R. F. (1992). In vivo growth of C6 glioma cells transfected with Cx43 cDNA. *Cancer Res.* 52: 4208-4213;
99. Navolotski, A., Rumjnzev, A., Lu, H., Proft, D., Bartholmes, P. & Zanker, K. S. (1997). Migration and gap junctional intercellular communication determine the metastatic phenotype of human tumor cell lines. *Cancer Lett.* 118:181-187;
100. Ngameni, B., M. Touaibia, et al. (2006). "Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a

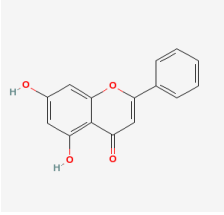
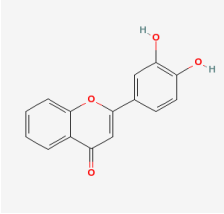
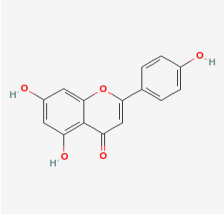
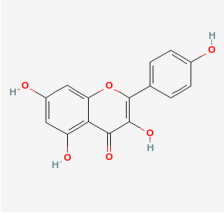
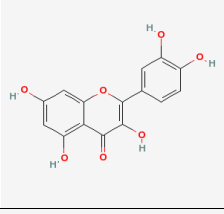
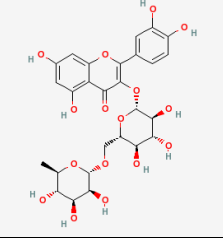
- furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*." *Phytochemistry* 67(23): 2573-9.
101. Norton, W. T., D. A. Aquino, et al. (1992). "Quantitative aspects of reactive gliosis: a review." *Neurochem Res* 17(9): 877-85.
  102. O'Callaghan, J. P. (1991). "Assessment of neurotoxicity: use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker." *Biomed Environ Sci* 4(1-2): 197-206.
  103. Oliveira, R., C. Christov, et al. (2005). "Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas." *BMC Cell Biol* 6(1): 7.
  104. Paillaud, E.; Costa, S.; Fages, C.; Plassat, J.L.; Rochette-Egly, C.; Perzelova, A.; Tardy, M. (2001a) Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eu. J Cancer* (37):520-530.
  105. Park, M. J., M. S. Kim, et al. (2002). "PTEN Suppresses Hyaluronic Acid-induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in U87MG Glioblastoma Cells through Focal Adhesion Kinase Dephosphorylation." *Cancer Res* 62(21): 6318-6322.
  106. Parnavelas, J. G. and B. Nadarajah (2001). "Radial glial cells. are they really glia?" *Neuron* 31(6): 881-4.
  107. Pentreath, V. W., M. R. Cookson, et al. (1994). "Trypanosoma brucei products activate components of the reactive response in astrocytes in vitro." *Bull Soc Pathol Exot* 87(5): 323-9.
  108. Perzelcova, A., Macikova, et al. (2000). "Co-expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in GL-15 glioblastoma cell line." *Neoplasma* 47(6): 362-6.
  109. Planchenault, T., S. Costa, et al. (2001). "Differential expression of laminin and fibronectin and of their related metalloproteinases in human glioma cell lines: relation to invasion." *Neurosci Lett* 299(1-2): 140-4.
  110. Pu, F., K. Mishima, et al. (2007). "Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats." *J Pharmacol Sci* 104(4): 329-34.
  111. Qin, H., Y. Sun, et al. (1999). "The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astroglia cells." *J Biol Chem* 274(41): 29130-7.
  112. Raghupathi, R. (2004). "Cell death mechanisms following traumatic brain injury." *Brain Pathol* 14(2): 215-22.

113. Rataboul, P., P. Vernier, et al. (1989). "Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat." *Brain Res Bull* 22(1): 155-61.
114. Rosell, A., J. Alvarez-Sabin, et al. (2005). "A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke." *Stroke* 36(7): 1415-20.
115. Rosenberg, G. A. (2009). "Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases." *Lancet Neurol* 8(2): 205-16.
116. Roth, W., C. Wild-Bode, et al. (2000). "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells." *Oncogene* 19(37): 4210-20.
117. Rouach, N., A. Koulakoff, et al. (2004). "Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks." *Neurochem Int* 45(2-3): 265-72.
118. Rutka, J. T., J. R. Giblin, et al. (1986). "Establishment and Characterization of a Cell Line from a Human Gliosarcoma." *Cancer Research* 46(11): 5893-5902.
119. Rutka, J. T., M. Murakami, et al. (1997). "Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review." *J Neurosurg* 87(3): 420-30.
120. Rutka, J.T. & Smith, S.L. (1993) Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acid protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res* (55): 3624-3631.
121. Sallinen, S. L., P. K. Sallinen, et al. (2000). "Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques." *Cancer Res* 60(23): 6617-22.
122. Sanfeliu, C., J. M. Wright, et al. (1999). "Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cell line." *Neurotoxicology* 20(6): 935-44.
123. Santos, B. L., A. R. Silva, et al. "Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells." *Food Chemistry* 127(2): 404-411.
124. Schartner JM, Hagar AR, Van Handel M, Zhang L, Nadkarni N, BADIE B. Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumour-associated microglia. *Glia* 2005; 51: 279–85.
125. Senger D, Cairncross JG, and Forsyth PA (2003). Long-term survivors of glioblastoma: statistical aberration or important unrecognized molecular subtype? *Cancer J* 9 (3), 214–221.

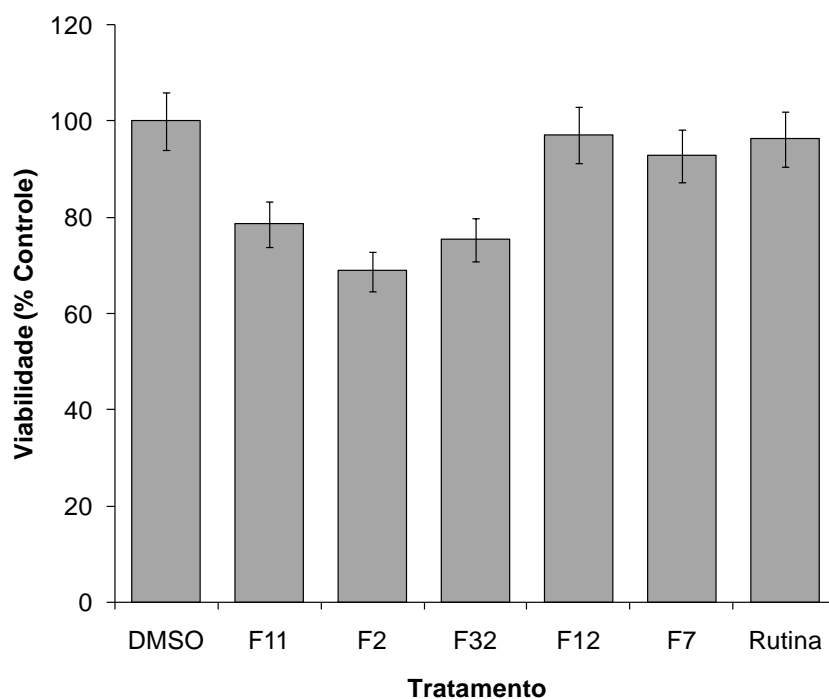
126. Shen, K.-H., S.-H. Hung, et al. "Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway." *Molecular and Cellular Biochemistry* 333(1): 279-291.
127. Silva AR, Hughes JB, Barreto RA, Souza JS, Costa MFD, El-Bachá RS, Velozo ES, Tardy M, Freire SM, Costa SL (2002) The flavonoid rutin, extracted from *dimorphandra mollis*, inhibits proliferation and stimulates differentiation of GL-15 human glioblastoma cells.. In: XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, , Cuiabá. Anais do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2002 [Resumo].
128. Silva AR, Pinheiro AM, Freitas SRVB, Santos CVCD, Velozo ES, Costa MFD, Freire SM, Tardy M, El-Bacha RS, Costa SL (2005) Effects of the flavonoid rutin on the expression of GFAP, TNF-alfa and IL-10 in rat cortical astrocytes.. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Aguas de Lindóia.
129. Sliwa, M., D. Markovic, et al. (2007). "The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A." *Brain* 130(2): 476-489.
130. Smirniotopoulos, J. G., F. M. Murphy, et al. (2007). "Patterns of Contrast Enhancement in the Brain and Meninges1." *Radiographics* 27(2): 525-551.
131. Soffietti R, Leoncini B, and Ruda R (2007). New developments in the treatment of malignant gliomas. *Expert Rev Neurother* 7 (10), 1313–1326.
132. Soroceanu, L., T. J. Manning, et al. (1999). "Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> Ion Channel Blockers." *The Journal of Neuroscience* 19(14): 5942-5954.
133. Souza, Cleide dos Santos. Efeitos do flavonóide agathisflavona obtido a partir de folhas da *Caesalpinia pyramidalis* na morfogênese de células de glioblastoma, neuroblastoma, co-cultura neurônio/glia e células tronco-embrionárias murinas. Dissertação de mestrado.
134. Streit, W. J., S. A. Walter, et al. (1999). "Reactive microgliosis." *Prog Neurobiol* 57(6): 563-81.
135. Stupp R, Hegi ME, Gilbert MR, and Chakravarti A (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25 (26), 4127–4136.
136. Tanwar, M. K., M. R. Gilbert, et al. (2002). "Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma." *Cancer Res* 62(15): 4364-8.
137. Tardy M (1991) Astrocyte et Homeostasie. *Médecine Science* 8 (7):799-804.



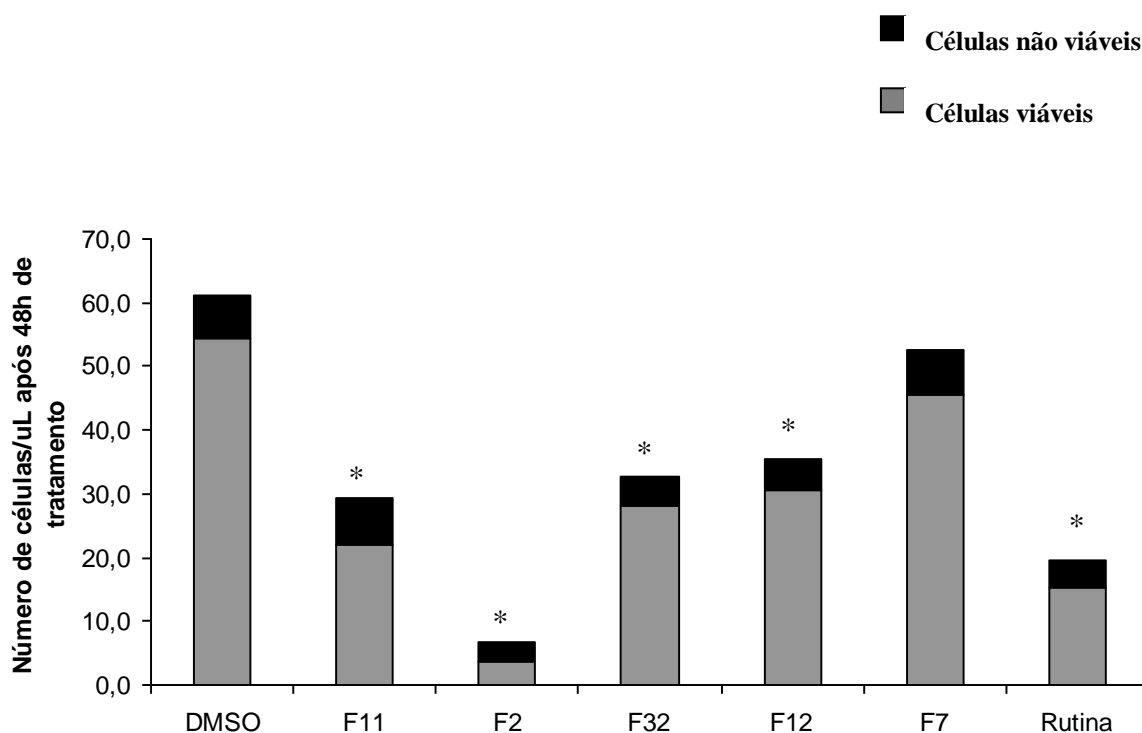
138. Tardy, M., G. Le Prince, et al. (1991). "Neuron-glia interaction. Effect of serotonin and DBcAMP on the expression of GFAP and its encoding message." *Ann N Y Acad Sci* 633: 630-2.
139. Tardy, M., M. F. Costa, et al. (1982). "Uptake and binding of serotonin by primary cultures of mouse astrocytes." *Dev Neurosci* 5(1): 19-26.
140. Vandier, D., O. Rixe, et al. (1998). "Selective killing of glioma cell lines using an astrocyte-specific expression of the herpes simplex virus-thymidine kinase gene." *Cancer Res* 58(20): 4577-80.
141. Vincent, L., W. Chen, et al. (2001). "Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect." *FEBS Lett* 495(3): 159-66.
142. Viola, H., C. Wolfman, et al. (2000). "6-Chloro-3'-nitroflavone is a potent ligand for the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor devoid of intrinsic activity." *Pharmacol Biochem Behav* 65(2): 313-20.
143. Wang, L., Y. Ling, et al. "Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells." *Cancer Letters* 297(1): 42-48.
144. Westphal, M., H. Nausch, et al. (1990). "Antigenic staining patterns of human glioma cultures: primary cultures, long-term cultures and cell lines." *J Neurocytol* 19(4): 466-77.
145. Yanamandra, N., K. V. Gumidyala, et al. (2004). "Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis." *Oncogene* 23(12): 2224-30.
146. Yoon, S. O., S. J. Park, et al. (2002). "Sustained production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway." *J Biol Chem* 277(33): 30271-82.
147. Yoshida, D., K. Watanabe, et al. (2003). "Apoptotic induction by BE16627B on human malignant glioma cell lines by an anti-matrix metalloproteinase agent." *Brain Tumor Pathology* 20(1): 13-19.
148. Zhang, L. X., R. V. Cooney, et al. (1991). "Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action." *Carcinogenesis* 12(11): 2109-14.
149. Zhang, W., W. T. Couldwell, et al. (1999). "Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes." *Cancer Res* 59(8): 1994-2003.

Flavonoide	Estrutura
<b>F11 - Crisina</b> 5,7-dihidroxi flavona	
<b>F2</b> 3',4'-diidroxiflavona	
<b>F32</b> Apigenina 4',5,7-trihidroxi flavona	
<b>F12</b> Kaempferol 3,4',5,7-tetrahidroxiflavona	
<b>F7</b> Quercetina 3,3',4',5,6-pentahidroxi flavona	
<b>Rutina</b> 3- ramnoglicosídeo de 3,3',4',5,6- pentahidroxi flavona	

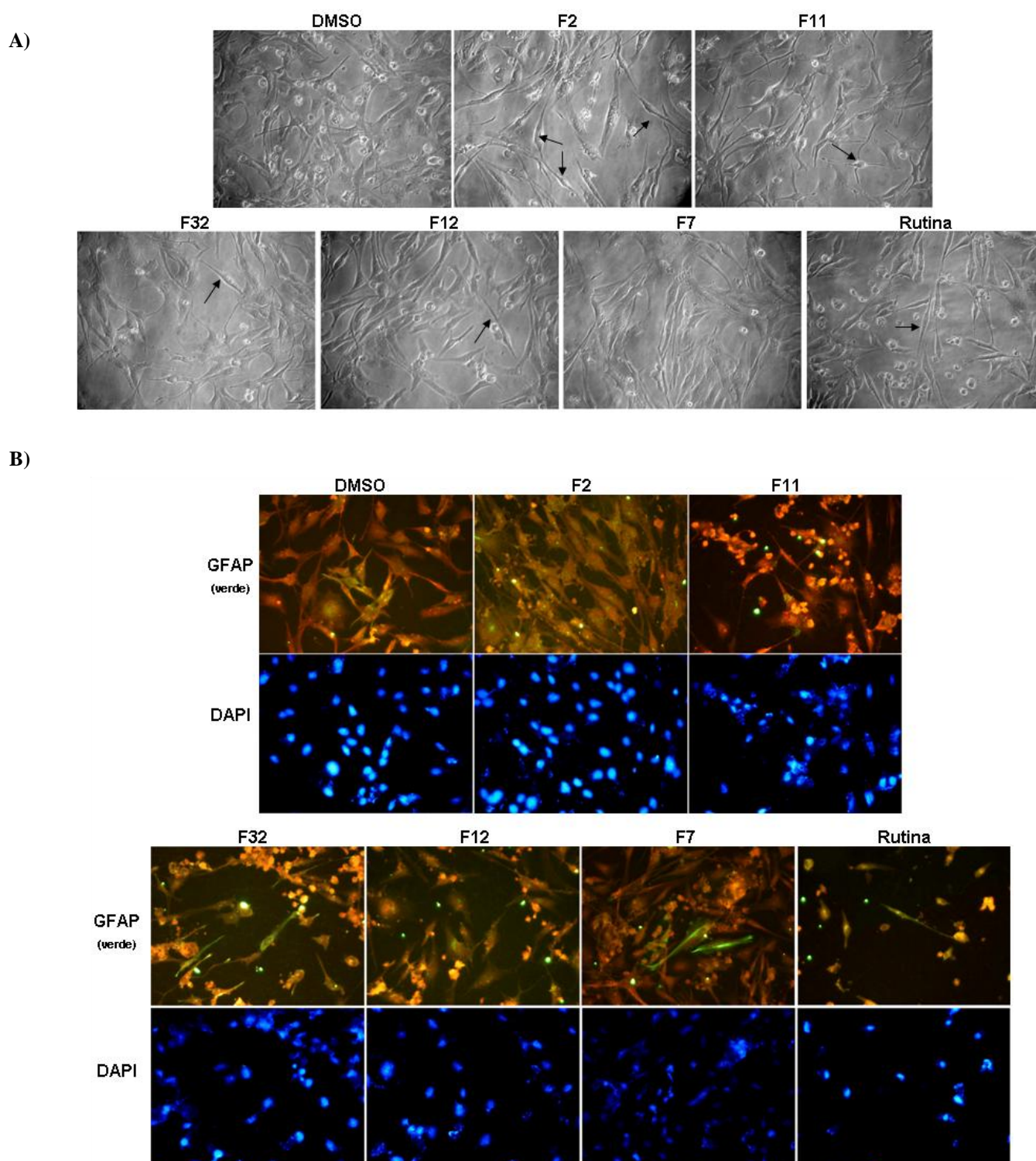
**Quadro 1-** Flavonoides testados em culturas de células de glioblastoma da linhagem GL-15. (Fonte dos modelos estruturais: PubChem Compound NCBI <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary>)



**Figura 1- Análise da citotoxicidade dos flavonóides em células GL-15 pelo teste do MTT.** As células GL-15 foram tratadas com o veículo de diluição das drogas (DMSO 0,1%) ou com flavonóides F11 (5,7-dihidroxiavona), F2 (3',4'-dihidroxiavona), F32 (4',5,7-trihidroxiavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiavona) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) ou rutina (3-ramnoglicósido da 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) na concentração de 50  $\mu$ M e a viabilidade celular avaliada após 48 h do tratamento. Resultados expressos como a média do percentual  $\pm$  desvio padrão em relação ao controle, considerado 100%. (\*) estatisticamente diferentes; significância  $p < 0.05$ .

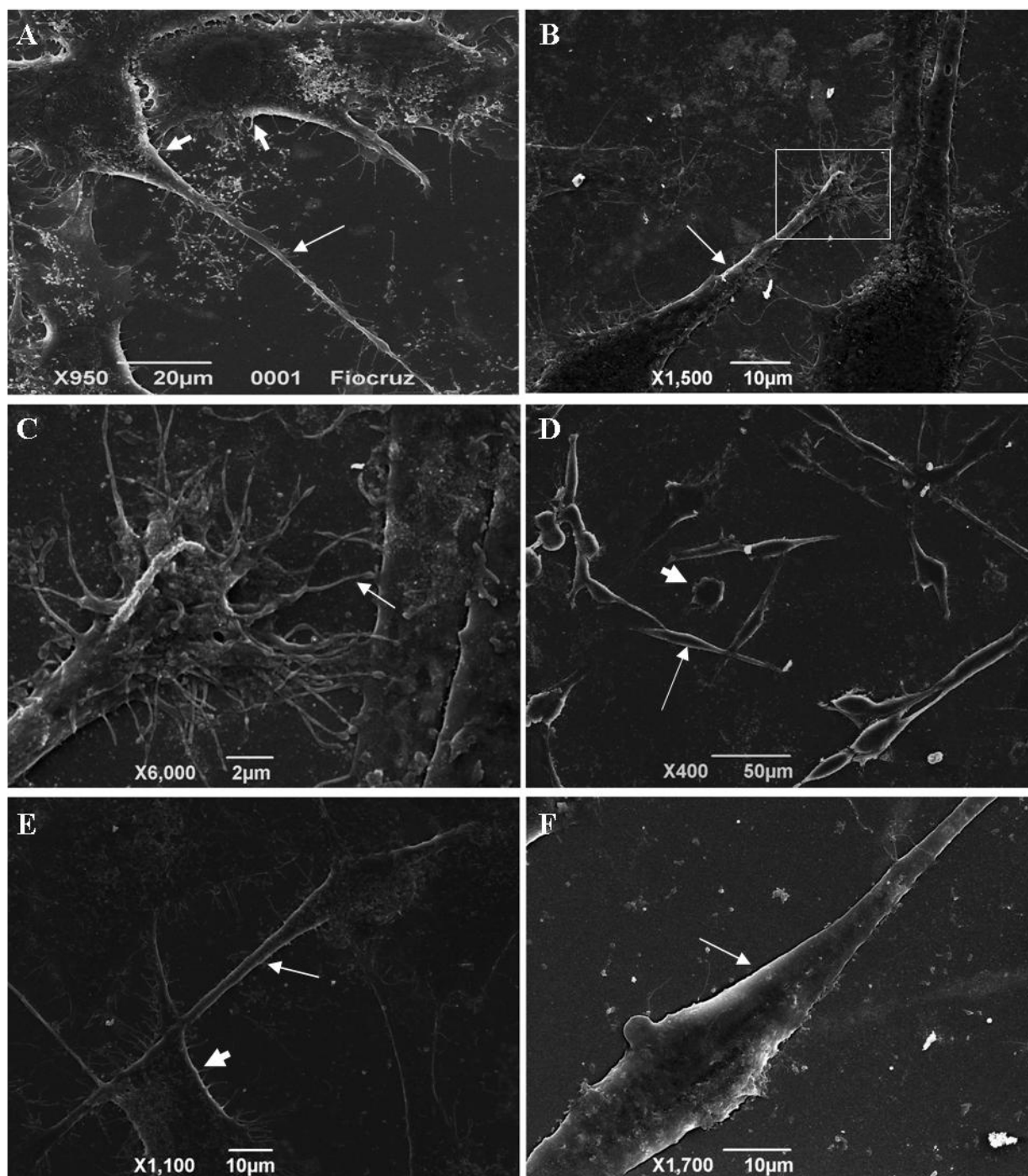


**Figura 2- Efeito de flavonóides polihidroxiados na viabilidade de células GL-15 pela coloração com azul de Tripán.** As células GL-15 foram tratadas com o veículo de diluição das drogas (DMSO 0,1%) ou com flavonóides F11 (5,7-dihidroxiavona), F2 (3',4'-dihidroxiavona), F32 (4',5,7-trihidroxiavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiavone), F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) na concentração de 50  $\mu\text{M}$  e a viabilidade celular avaliada após 48 h do tratamento. Resultados expressos como a média do número de células viáveis e não viáveis em relação ao controle (DMSO 0,1%). (\*) estatisticamente diferentes; significância  $p < 0.05$ .



**Figura 3- Análise por microscopia em contraste de fase e imunomarcção para a proteína GFAP em células da linhagem GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, por 48h. A- Microscopia em contraste de fase das células GL-15 tratadas com flavonóides. B- Imunomarcção para a proteína GFAP em células GL-15. Fixação antes da marcação. As células apresentam marcação intracelular e extracelular. Marcação

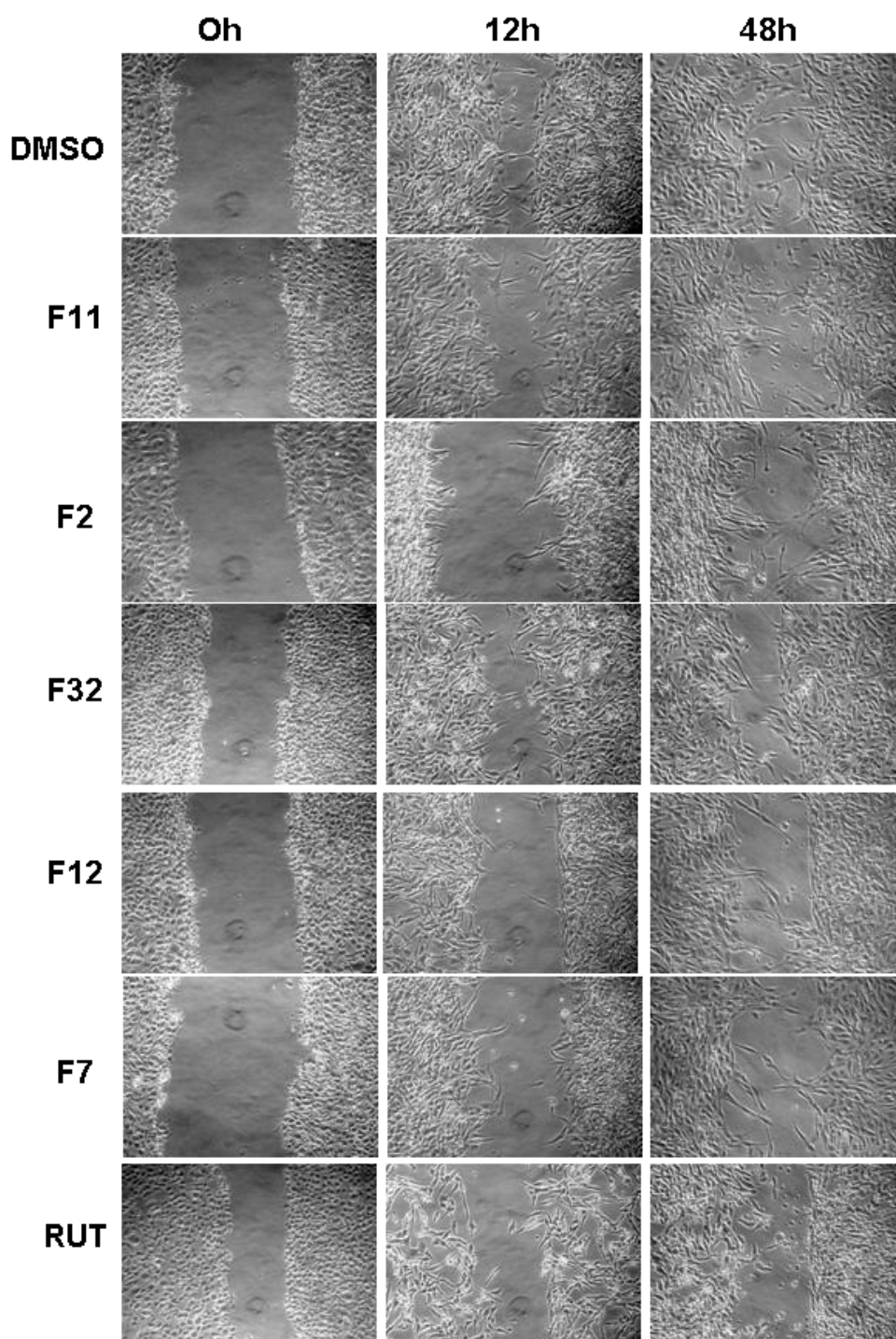
vermelha (Evans Blue -10mg/mL – Fluka): citoplasma; marcação verde: GFAP e marcação azul (DAPI - 5µg/ml): núcleo. DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%; F2 (3',4'-dihidroxiavona), F11 (5,7-dihidroxiavona); F32 (4',5,7-trihidroxiavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiavona); F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona). Objetiva 20 x 0.70.



**Figura 4- Análise por microscopia eletrônica de varredura de células da linhagem GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, por 48h. Células na condição controle (Fig. A, B e C). Células tratadas (Fig. D, E e F). A: células apresentando heterogeneidade morfológica (seta pequena), com emissão de longos prolongamentos citoplasmáticos com filopodias presentes (seta fina branca). B: células apresentando aspecto fusiforme com filopodias distribuído em toda a extensão do prolongamento (seta branca). C. Imagem ampliada da Fig. B, destacando filopodias (seta branca) na

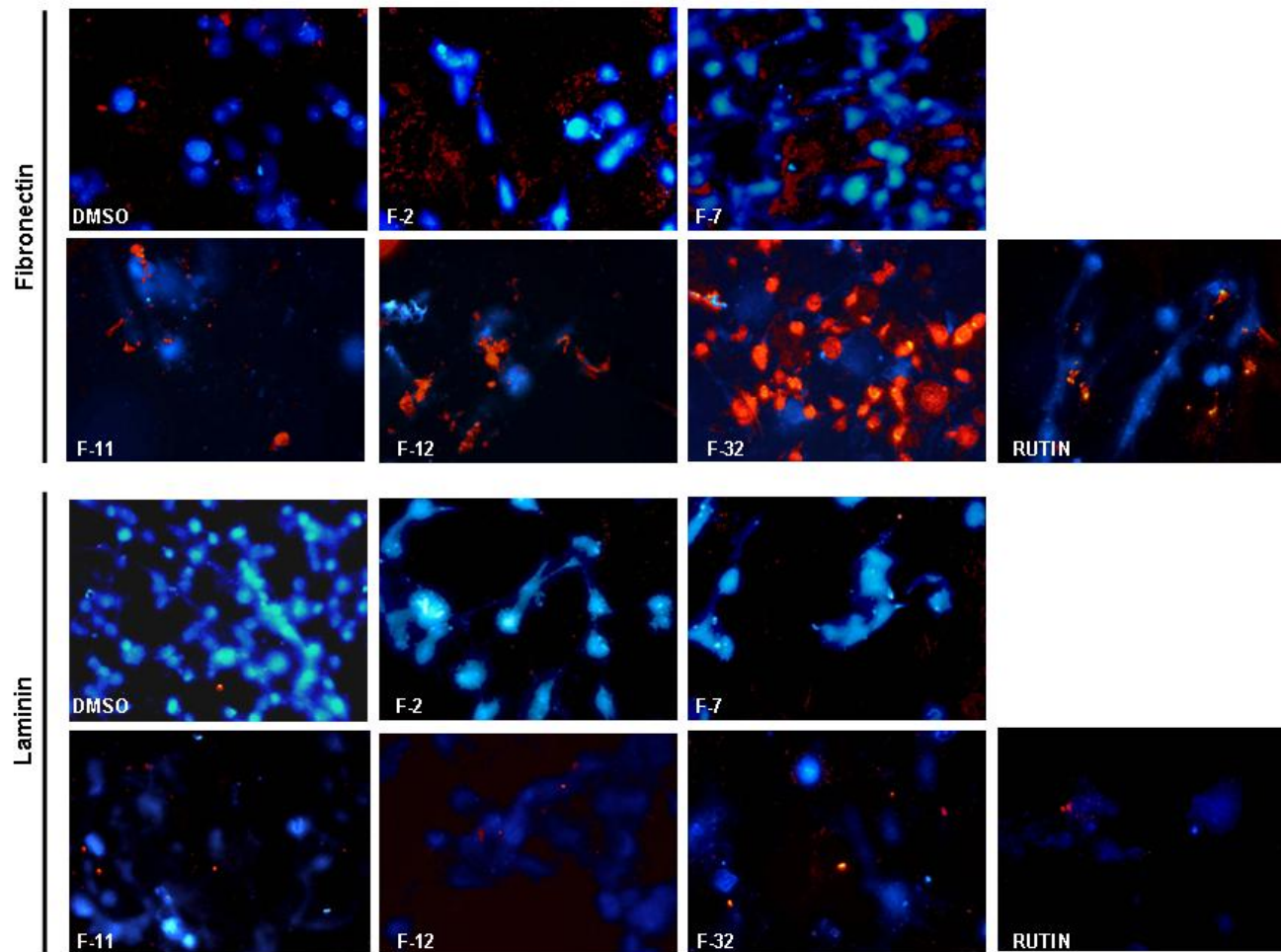
extremidade do prolongamento citoplasmático. D: células com aspecto fusiforme (seta fina), e células esféricas (cabeça de seta). E: células com aspecto fusiforme, apresentando extensas projeções citoplasmáticas, com reduzido número de filopódias (seta fina) e outras com filopodias evidentes (cabeça de seta). F: célula bipolar, sem evidência de filopódias.





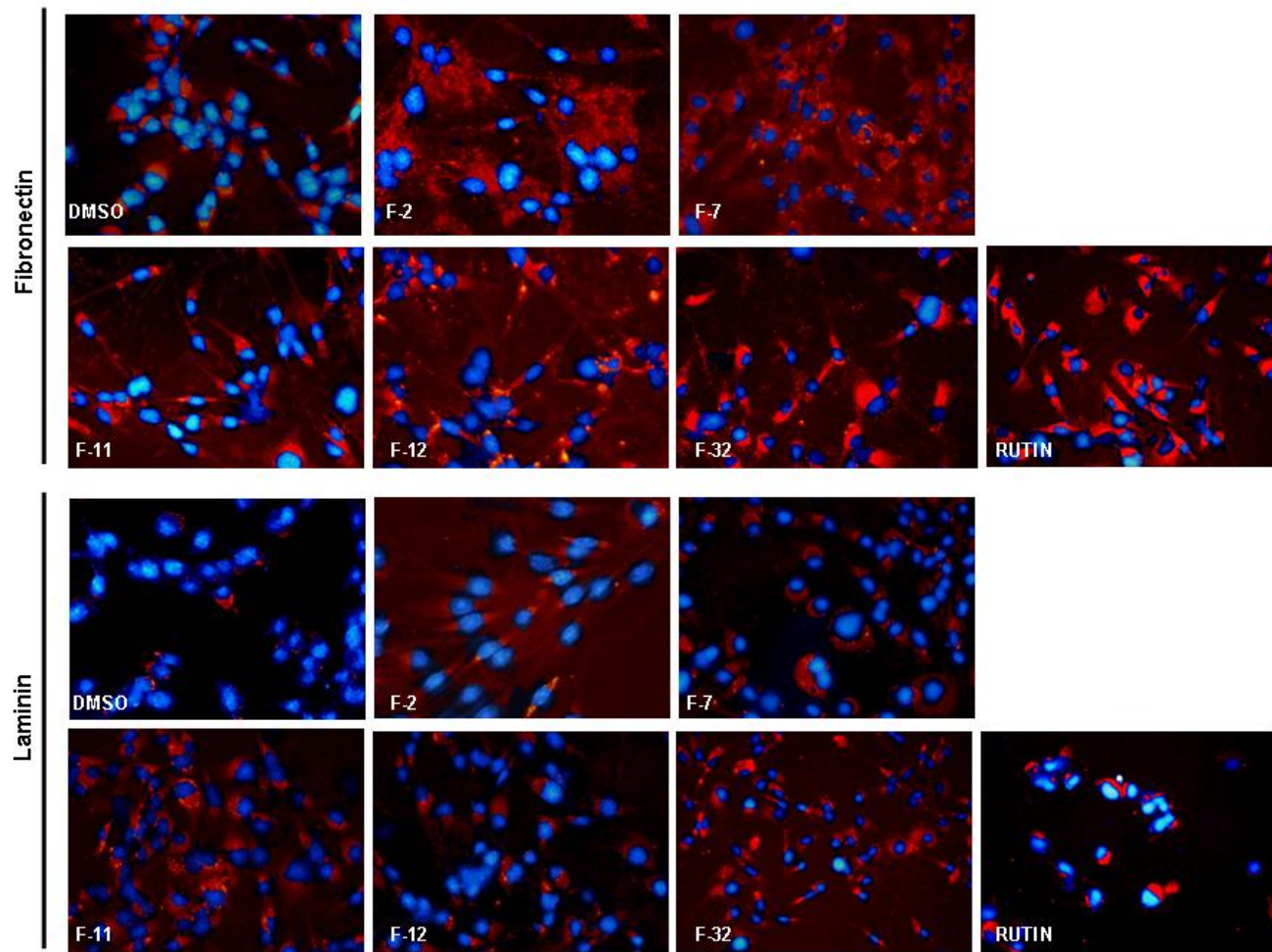
**Figura 5- Ensaio de migração em monocamada de células GL-15.** Imagens visualizadas em microscopia com contraste de fase. Objetiva 20x. Os tempos indicados (0, 12 e 48 horas) referem-se a duração do tratamento após a lesão na monocamada de células. Grupo controle (DMSO 0,1%). Tratamento com os flavonóides a 50 $\mu$ M: F11 (5,7-dihidroxi-flavona), F2 (3',4'-dihidroxi-flavona), F32 (4',5,7-trihidroxi-flavona), F12 (3,4',5,7-tetra-hidroxi-flavona) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona).





**Figura 6- Imunomarcção das proteínas de MEC fibronectina e laminina, expressas a nível extracelular, em células GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M por 48h. Fixação realizada após marcação. As células apresentam marcação extracelular. Marcação vermelha: fibronectina ou laminina; marcação azul (DAPI - 5 $\mu$ g/ml): núcleo. DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%; F11 (5,7-dihidroxiavona), F2 (3',4'-dihidroxiavona), F32 (4',5,7-trihidroxiavona),

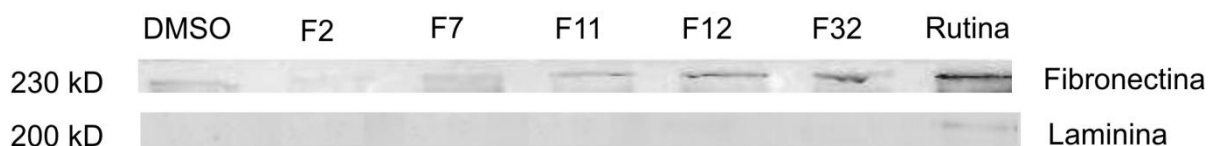
F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiflavone ) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiflavona) ou rutin (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxiflavona). Objetiva 20 x 0.70.



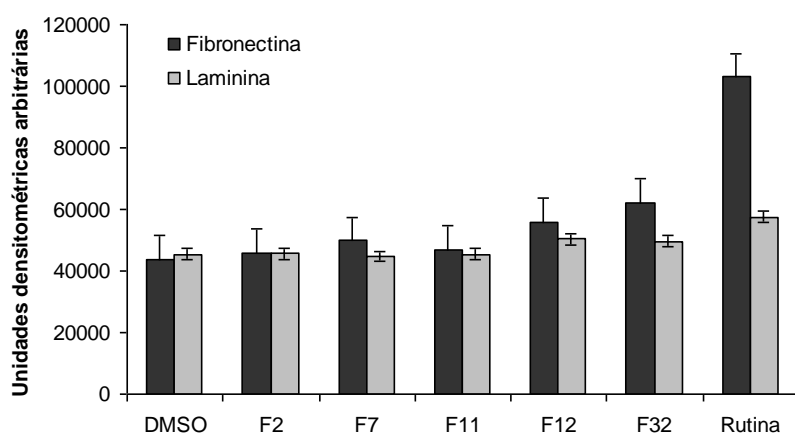
**Figura 7- Imunomarcção das proteínas de MEC fibronectina e laminina expressas em células GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, por 48h. Fixação realizada antes da marcação. As células fixadas mostram marcação intracelular e extracelular. Marcação vermelha: fibronectina ou laminina;

marcação azul (DAPI - 5µg/ml): núcleo. DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%; F11 (5,7-dihidroxiavona), F2 (3',4'-dihidroxiavona), F32 (4',5,7-trihidroxiavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiavone ) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) ou rutin (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona). Objetiva 20 x 0.70.

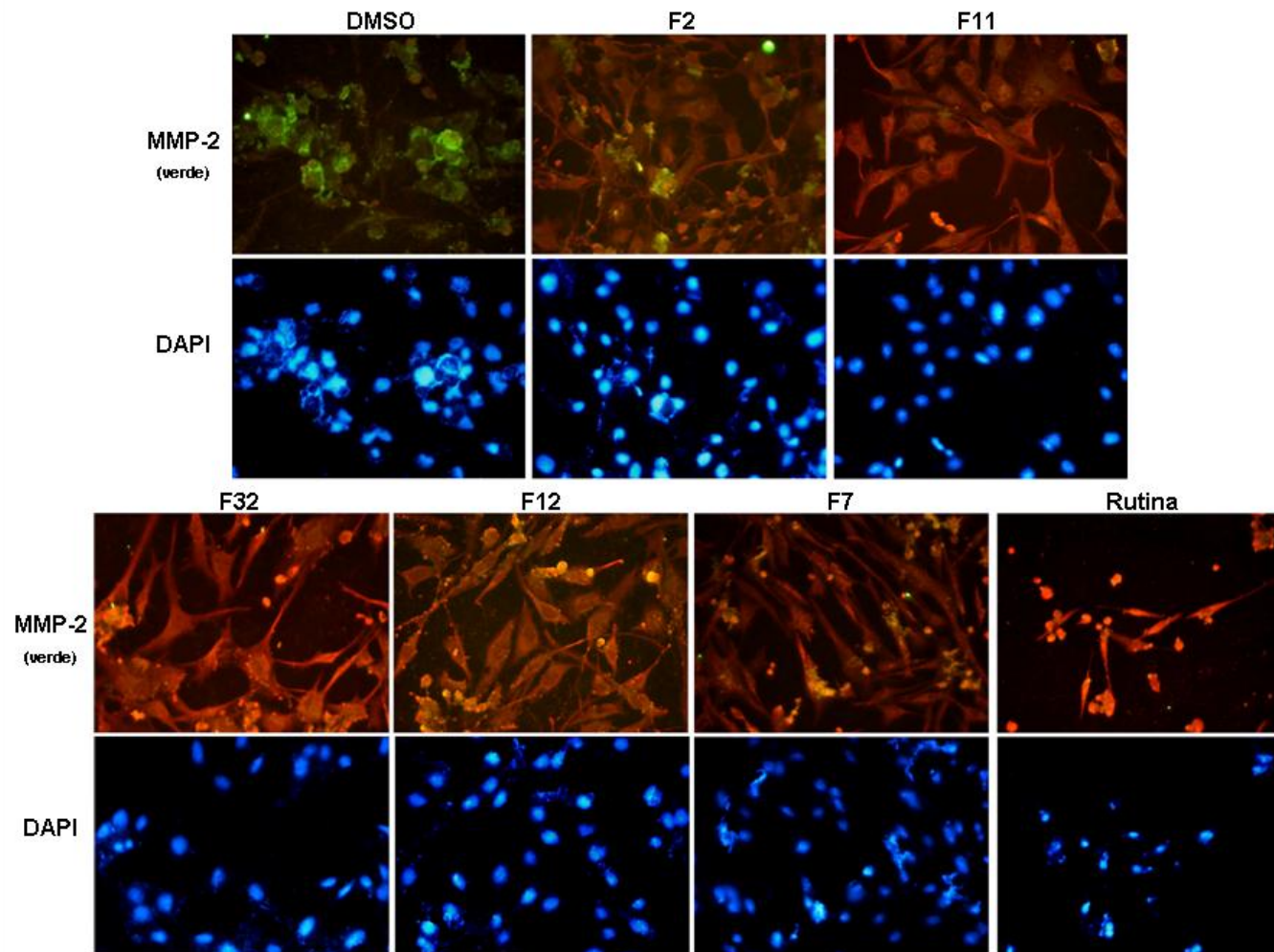
A)



B)



**Figura 8. Análise da expressão de fibronectina (230kD) e laminina (200 kD) em cultura confluenta de células da linhagem GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, por 48h. **A-** A amostra protéica (30 $\mu$ g) foi submetida a eletroforese SDS-PAGE (7,5%), seguida de imunoblotting, usando anticorpo policlonal anti-fibronectina (Sigma, F3648, 1/2000) e anti-laminina (Sigma, L9393, 1/1000). DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%; F11 (5,7-dihidroxi-flavona), F2 (3',4'-dihidroxi-flavona), F32 (4',5,7-trihidroxi-flavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxi-flavone); F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxi-flavona). A figura mostra um dos três experimentos independentes que apresentaram resultados semelhantes. **B-** Análise densitométrica das bandas de expressão de fibronectina e laminina.

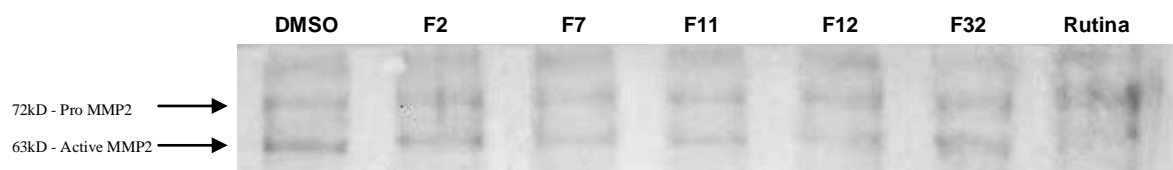


**Figura 9- Imunomarcaco das MMP-2 expressas em células GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentrao de 50 µM, por 48h. As células fixadas mostram marcao intracelular e extracelular. Marcao

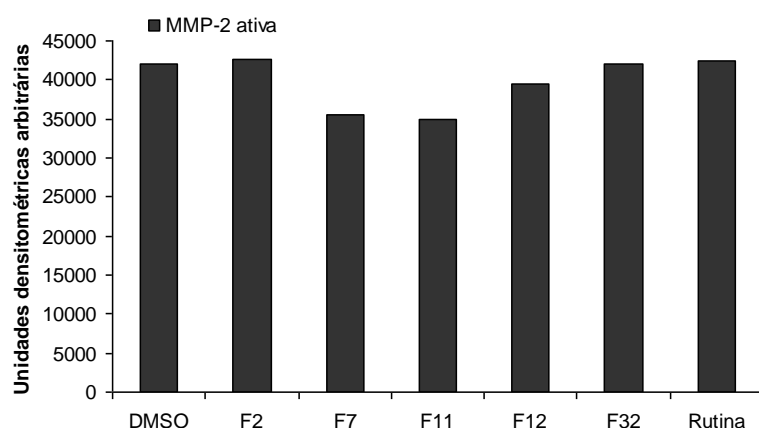


verde: MMP-2; marcação vermelha (Evans Blue -10mg/mL – Fluka): citoplasma; marcação azul (DAPI - 5µg/ml): núcleo. Fixação realizada antes da marcação. DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%; F11 (5,7-dihidroxiavona), F2 (3',4'-dihidroxiavona), F32 (4',5,7-trihidroxiavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiavone ) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona). Objetiva 20 x 0.70.

A)

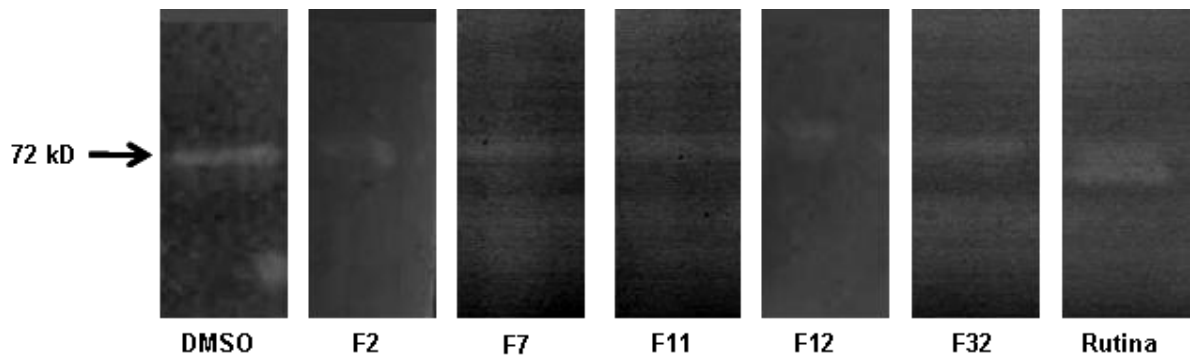


B)

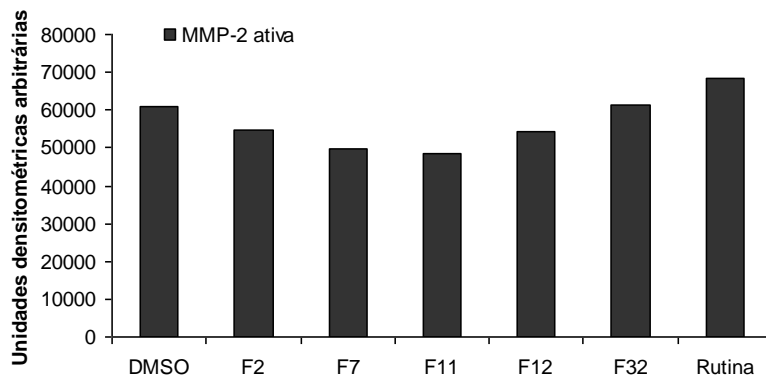


**Figura 10- Análise por western blot da expressão das MMP-2 em culturas de células da linhagem GL-15. A-** Análise através de western blotting da expressão de matriz-metaloproteinases em células de glioblastoma multiforme da linhagem GL-15, após 48 horas de tratamento em condição controle (DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%) e tratamento com os flavonóides a 50 $\mu$ M: F11 (5,7-dihidroxiavona), F2 (3',4'-dihidroxiavona), F32 (4',5,7-trihidroxiavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxiavone ) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxiavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxiavona). Peso molecular em kDa está indicado à esquerda na figura. A figura mostra uma dos três experimentos independentes que apresentaram resultados semelhantes. **B-** Análise densitométrica das bandas de expressão de MMP-2 ativa.

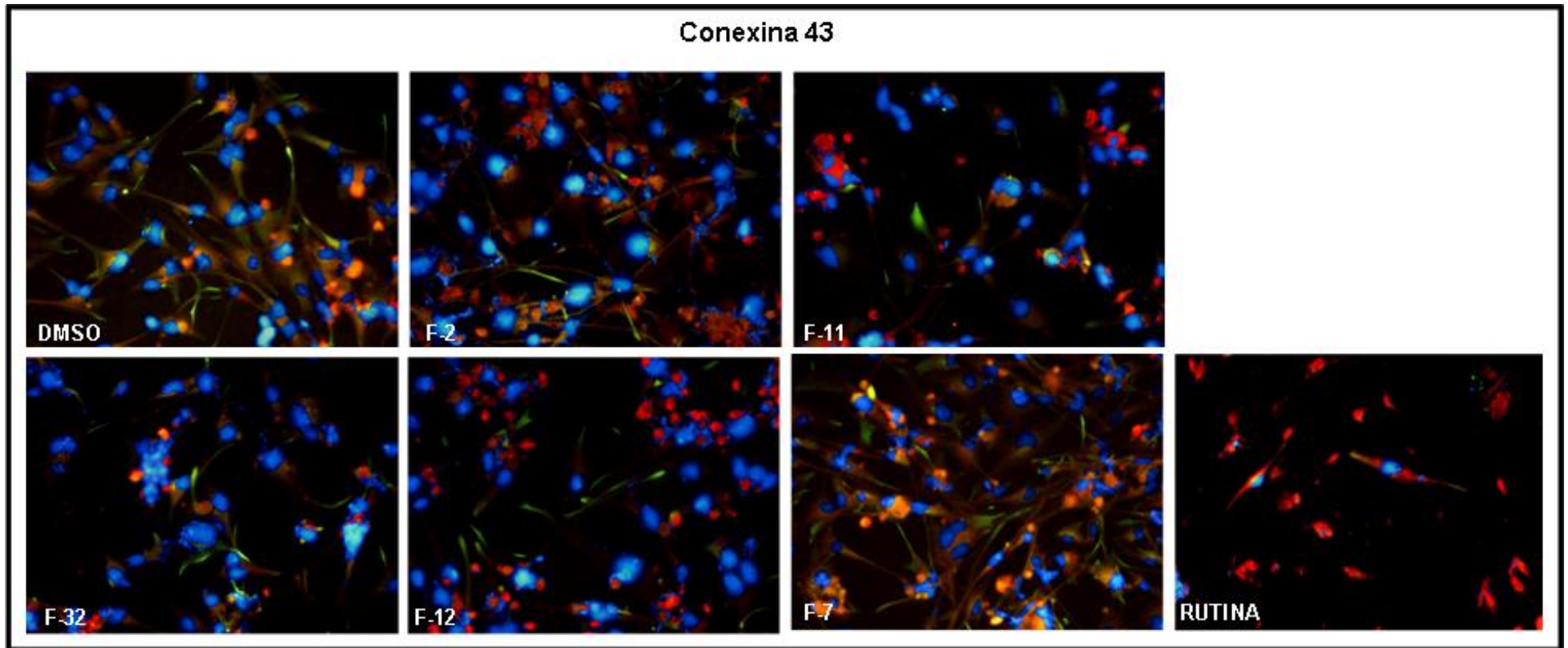
A)



B)



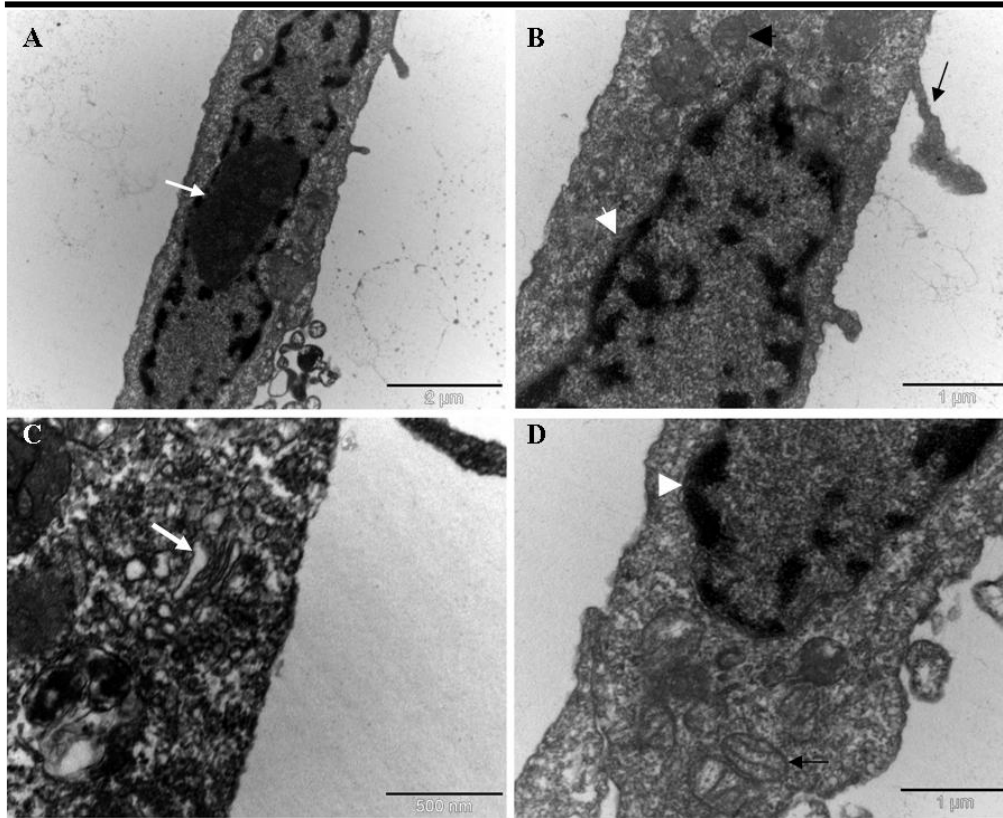
**Figura 11- Análise zimográfica da atividade gelatinase de MMPs e em culturas de células da linhagem GL-15. A-** Atividade avaliada no sobrenadante de GL-15, analisado pelo ensaio de zimografia em gelatina a 1%, após 24 horas de tratamento na condição controle (DMSO 0,1% ), e tratamento com os flavonoides [50  $\mu$ M] F11 (5,7-dihidroxi flavona), F2 (3',4'-dihidroxi flavona), F32 (4',5,7-trihidroxi flavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxi flavone ) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxi flavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxi flavona). Peso molecular do marcador em kDa está indicado à esquerda da figura. **B-** Análise densitométrica das bandas de degradação enzimática.



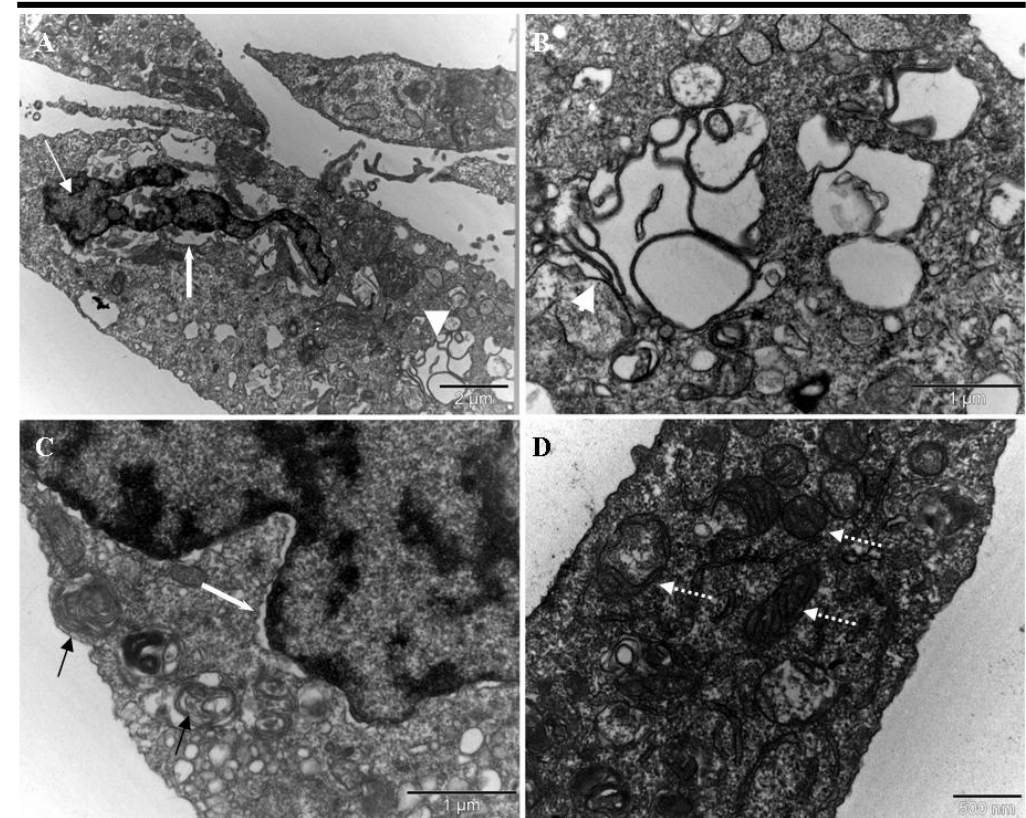
**Figura 12- Imunomarcção de Cx-43 expressas em células GL-15.** As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, por 48h. As células fixadas mostram marcação intracelular e extracelular. Marcação verde: conexina-43; marcação vermelha (Evans Blue -10mg/mL – Fluka): citoplasma; marcação azul (DAPI - 5 $\mu$ g/ml): núcleo. Fixação realizada antes da marcação. DMSO: dimetilsulfóxido 0,1%; F11 (5,7-dihidroxi flavona), F2 (3',4'-dihidroxi flavona), F32

(4',5,7-trihidroxi flavona), F12 (3,4',5,7-tetrahidroxi flavone ) F7 (3,3',4',5,6-pentahidroxi flavona) ou rutina (3-ramnoglicosídeo da 3,3',4',5,6-pentahidroxi flavona). Objetiva 20 x 0.70.

### 1- Condição controle



### 2- Células Tratadas



**Figura 13- Análise por microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem GL-15.** 1- As células GL-15 foram tratadas com o DMSO a 0,1% ou com flavonóides na concentração de 50  $\mu$ M, por 48h. Células em condição controle (DMSO 0,1%). A: células apresentando núcleo longo com cromatina dispersa e nucléolo grande e centralizado ao núcleo (seta branca). B: Presença de estrutura tipo filopodia na superfície da membrana (seta escura) e RER de aspecto preservado (cabeça de seta branca). Nota-se também a presença de mitocôndrias pequenas com aspecto esférico. C: Complexo de Golgi de aspecto

preservado (seta branca). D: RER preservado (cabeça de seta branca) e mitocôndrias curtas esféricas e eletrolucentes. **2-** Microscopia eletrônica de transmissão de células da linhagem GL-15 tratadas com flavonóides. A: células apresentando núcleo de aspecto retraído (seta fina branca), com RER dilatado (seta grossa branca). Observa-se também a presença de cisternas do complexo de Golgi muito dilatadas (cabeça de seta branca). B: Imagem ampliada do complexo de Golgi, mostrado dilatação das cisternas (cabeça de seta branca). C: RER dilatado (seta grossa branca) e presença de figuras de mielina (setas escuras). D: Mitocôndrias com morfologia e tamanho variados, mais eletrodensas e mostrando aspecto de cristólise (setas tracejadas branca).

## CONCLUSÕES

Nossos resultados *in vitro* demonstraram que:

- a)** O flavonóide rutina apresenta capacidade para inibir a proliferação celular através da via ERK/MAPK, induzir apoptose e diferenciação em células de glioblastoma multiforme humano da linhagem GL-15;
- b)** Os flavonóides polihidroxilados 3',4'-dihydroxiflavona, crisina, kaempferol, quercetina, apigenina e rutina apresentam efeito morfogênico, induzindo as células a assumir um fenótipo bipolar e a expressarem GFAP, características estas de diferenciação astrogliar;
- c)** Os flavonóides polihidroxilados apresentaram efeito anti-migratório e anti-invasivo em células de glioblastoma multiforme humano da linhagem GL-15, pois induziram aumento na expressão de proteínas de MEC associadas a adesão celular e reduziram a atividade e expressão de MMP-2, bem como a formação de processos citoplasmáticos (filopodias) associados a atividade migratória celular;
- d)** Os flavonóides polihidroxilados foram capazes de induzir apoptose em células de glioblastoma da linhagem GL-15.



## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Em nosso trabalho, mostramos o efeito de flavonóides em induzir diferenciação celular, aumentar a expressão de proteínas de MEC associadas a adesão celular, e em inibir a expressão e atividade de MMPs, bem como a formação de protrusões citoplasmáticas finas (filopodias), associados aos processos de migração e invasão celular. Entretanto, ainda é preciso investigar o mecanismo de ação destes flavonóides em células de glioma bem como investigar os mecanismos moleculares envolvidos nas respostas antiproliferativa e antitumoral, induzidas pelos flavonóides. Portanto, pretendemos em trabalhos futuros, investigar os efeitos dos flavonóides nas vias de sinalização envolvidas com a proliferação e migração em células de gliomas.

**REFERÊNCIAS GERAIS**

1. ADRAIN, C., MARTIN, S. J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in Biochemistry Science*, 26(6), 390–397.
2. ALOISI, F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*; 36:165–179.
3. ALONSO, G. (2001). Proliferation of progenitor cells in the adult rat brain correlates with the presence of vimentin-expressing astrocytes. *Glia*, 34(4), 253-266.
4. ALONSO, M., C. TAMASDAN, et al. (2003). "Flavopiridol Induces Apoptosis in Glioma Cell Lines Independent of Retinoblastoma and p53 Tumor Suppressor Pathway Alterations by a Caspase-independent Pathway1." *Molecular Cancer Therapeutics* 2(2): 139-150.
5. ALVAREZ-BUYLLA A, GARCIA-VERDUGO JM (2002) Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22:629–634
6. ARCURI, C., M. TARDY, et al. (1995). "Glutamine synthetase gene expression in a glioblastoma cell-line of clonal origin: regulation by dexamethasone and dibutyryl cyclic AMP." *Neurochem Res* 20(10): 1133-9.
7. ASCHNER M (1998) Astrocytes as Mediators of Immune and Inflammatory Responses in the CNS. *Neurotoxicology*; 19 (2):269-81.
8. ASCHNER, M. (1998). "Immune and inflammatory responses in the CNS: modulation by astrocytes." *Toxicol Lett* 102-103: 283-7.
9. AULD, D. S. & R. ROBITAILLE (2003). "Glial Cells and Neurotransmission: An Inclusive View of Synaptic Function." *Neuron* 40(2): 389-400.
10. BEIER, D., P. HAU, et al. (2007). "CD133+ and CD133- Glioblastoma-Derived Cancer Stem Cells Show Differential Growth Characteristics and Molecular Profiles." *Cancer Res* 67(9): 4010-5.
11. BILZER, T., D. STAVROU, et al. (1991). "Antigen variation in a human glioblastoma: from the primary tumor to the second recurrence, permanent cell line and xenotransplantation tumors." *Anticancer Res* 11(2): 547-53.
12. BILZER, T., D. STAVROU, et al. (1991). "Morphological, immunocytochemical and growth characteristics of three human glioblastomas established in vitro." *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 418(4): 281-93.
13. BOCCHINI V, CASALONE R, COLLINI, P, REBEL, G, CURTO LF (1991) Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two

- cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res* 265(1):73-81.
14. BOCCHINI, V., T. BECCARI, et al. (1993). "Glial fibrillary acidic protein and its encoding mRNA exhibit mosaic expression in a glioblastoma multiform cell line of clonal origin." *International Journal of Developmental Neuroscience* 11(4): 485-492.
  15. BOEIRA, J.M., DA SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J. A. P. (2001). Genotoxic effects of the alkaloids harman and harmine assessed by comet assay and chromosome aberration test in mammalian cells in vitro. *Pharmacology and Toxicology*, 89(6), 287-294.
  16. BRAGANHOL, E., ZAMIN, L. L., CANEDO, A. D., HORN F., TAMAJUSUKU, A. S., WINK, M. R., SALBEGO, C., BATTASTINI, A. M. (2006). Antiproliferative effect of quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Anticancer Drugs*, 17(6), 663-671.
  17. BRANDES, A. A., Pasetto. L. M., Monfardini. S. (2000). New drugs in recurrent high grade gliomas. *Anticancer Research*. 20(3), 1913-1920.
  18. BURGER PC, VOGEL FS, GREEN SB, AND STRIKE TA (1985). Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications. *Cancer* 56 (5), 1106–1111.
  19. BURROWS, T. D., A. KING, et al. (1993). "Expression of integrins by human trophoblast and differential adhesion to laminin or fibronectin." *Hum Reprod* 8(3): 475-84.
  20. CHAMBAUT-GUERIN, A. M., S. L. COSTA, et al. (2000). "Effects of retinoic acid and tumor necrosis factor alpha on GL-15 glioblastoma cells." *Neuroreport* 11(2): 389-93.
  21. CHEN, T.J., JENG, J. Y., LIN, C. W., WU, C.Y., CHEN, Y.C. (2006). Quercetin inhibition of ROS-dependent and -independent apoptosis in rat glioma C6 cells. *Toxicology*, 223, 113- 126.
  22. CHRISTOPHERSON KS, ULLIAN EM, STOKES CC et al (2005) Thrombospondins are astrocyte secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell* 120:421–433
  23. CLEMENT AM, NADANAKA S, MASAYAMA K, MANDL C, SUGAHARA K, FAISSNER A (1998). The DSD-1 Carbohydrate Epitope depends on sulfation, correlates with chondroitin sulfate D motifs, and is sufficient to promote neurite outgrowth. *J. Biolog. Chem.* 273 (43):28444-53.
  24. COOKSON MR, PENTREATH VW (1994). Alterations in the glial fibrillary acidic protein content of primary astrocyte cultures for evaluation of glial cell toxicity. *Toxic In vitro* 8 (3):351-9.

25. COOKSON, B. T., S. ENGELHARDT, et al. (1994). "Organization of the human annexin V (ANX5) gene." *Genomics* 20(3): 463-7.
26. COOKSON, M. S. AND M. F. SAROSDY (1994). "Hormonal therapy for metastatic prostate cancer: issues of timing and total androgen ablation." *South Med J* 87(1): 1-6.
27. COSTA SL, PAILLAUD E, FAGES C, ROCHETTE-EGLY C, JOUAULT H, PERZELOVA A, TARDY M (2001) Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eu. J Cancer* 37:520-530.
28. COSTA SL, PLANCHENAU T, CHARRIERE-BERTRAND C, MOUCHEL Y, FAGES C, JULIANO S, ET AL. (2002). Astroglial Permissivity for Neurotic Outgrowth in Neuron-Astrocyte CoCultures Depends on Regulation of Lamini Bioavailability. *Glia* 37:105-13.
29. COSTA SL, RICHE D, FAGES C, ROCHETTE-EGLY C, TARDY M (2002) Efeitos in vitro do ácido retinóico em células de glioblastoma. *Revista Ciências Médicas e Biológicas* 1:49-60.
30. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (2000). *Patologia Estrutural e Funcional Robbins*. 6ª edição. Guanabara Koogan. 233-1201.
31. DAHL, D., RUEGER, D. C., BIGNAMI, W. K., OSBOM, M. (1981). Vimentin, the 57,000 dalton protein of fibroblasts, is the major cytoskeletal component in immature glia. *European Journal of Cell Biology*, 24(6), 191-196.
32. DAUMAS-DUPOINT, C., B. SCHEITHAUER, et al. (1988). "Grading of astrocytomas. A simple and reproducible method." *Cancer* 62(10): 2152-65.
33. DAUMAS-DUPOINT, C., B. W. SCHEITHAUER, et al. (1988). "Dysembryoplastic neuroepithelial tumor: a surgically curable tumor of young patients with intractable partial seizures. Report of thirty-nine cases." *Neurosurgery* 23(5): 545-56.
34. DAVIES, D. L., I. R. NIESMAN, ET AL. (2000). "Heterogeneity of astroglia cultured from adult human temporal lobe." *Int J Dev Neurosci* 18(2-3): 151-60.
35. DEFER GL, ADLE-BIASSETTE H, RICOLFI, F, MARTIN L, AUTHIER FJ, CHOMIENEN C, DEGOS L, DEGOS JD (1997) All-trans retinoic acid in relapsing malignant gliomas: clinical and radiological stabilization associated with the appearance of intratumoral calcifications. *J. Neur Oncol* 34(2):169-177.
36. DEMUTH TAND BERENS ME (2004). Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *J Neurooncol* 70 (2), 217–228.

37. DESCHNER, E. E., RUPERTO, J., WONG, G., NEWMARK, H. L. (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis*, 12(7), 1193-1196.
38. DESHANE, J., C. C. GARNER, et al. (2003). "Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2." *J Biol Chem* 278(6): 4135-44.
39. DICKSON DW, LEE, SC, MATTIACE LA; YEN SH, BROSNAN C (1993). Microglia and cytokines in neurological disease, with special reference to AIDS and Alzheimer's disease. *Glia* 7(1):75-83.
40. EDDLESTON M, & MUCKE L (1993). Molecular profile of reactive astrocytes: implication for their role in neurological disease. *Neuroscience* 54(1):15-36.
41. ELIAS, P. M. & FRIEND, D.S. (1976). Vitamin-A-induced mucous metaplasia. An in vitro system for modulating tight and gap junction differentiation. *J Cell Biol.*68:173-188;
42. FERNANDEZ, S.P., WASOWSKI, C., LOSCALZO, L. M., GRANGER, R. E., JOHNSTON, G. A. R., PALADINI, A. C., MARDER, M. (2006). Central nervous system depressant action of flavonoid glycosides. *European Journal of Pharmacology*, 539(3), 168-176.
43. FLUGEL A, LABEUR MS, GRASBON-FRODL EM, KREUTZBERG GW, GRAEBER MB. (1999). Microglia only weakly present glioma antigen to cytotoxic T cells. *Int J Dev Neurosci*; 17: 547-56.
44. FRANKFURT, M., J. O'CALLAGHAN, ET AL. (1991). "5,7-Dihydroxytryptamine injections increase glial fibrillary acidic protein in the hypothalamus of adult rats." *Brain Res* 549(1): 138-40.
45. FREITAS, S., S. COSTA, et al. (2010). "Flavonoids inhibit angiogenic cytokine production by human glioma cells." *Phytotherapy Research* 25(6): 916-921.
46. FRESCO, P., BORGES, F., DINIZ, C., MARQUES, M.P. (2006). New insights on the anticancer properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, 26(6),747-766.
47. GAO, C., K. FURGE, et al. (2007). "Chromosome instability, chromosome transcriptome, and clonal evolution of tumor cell populations." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(21): 8995-9000.
48. GARWOOD, J., O. SCHNADELBACH, et al. (1999). "DSD-1-proteoglycan is the mouse homolog of phosphacan and displays opposing effects on neurite outgrowth dependent on neuronal lineage." *J Neurosci* 19(10): 3888-99.
49. GIULIAN D, LEARA J, LI J, KEENEN C (1994). Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neurochem. Int.* 25(3):227-233.

50. GOFFMAN TE, DACHOWSKI LJ, BOBO H, OLDFIELD EH, STEINBERG SM, COOK J, MITCHELL JB, KATZ D, SMITH R, AND GLATSTEIN E (1992). Long-term followup on National Cancer Institute Phase I/II study of glioblastoma multiforme treated with iododeoxyuridine and hyperfractionated irradiation. *J Clin Oncol* 10 (2), 264–268.
51. GOMES FC, DE SAMPAIO e SPOHR TC, MARTINEZ R, MOURA NETO, V (2001) Cross-talk between neurons and glia: highlights on soluble factors. *Braz J Med Biol Res* 34:611–620
52. GOMES FCA, PAULIN D, MOURA NET V (1999). Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in astrocyte differentiation. *Braz J Med Biol Res* 32:619-31.
53. HAAS, T. L. and J. A. MADRI (1999). "Extracellular matrix-driven matrix metalloproteinase production in endothelial cells: implications for angiogenesis." *Trends Cardiovasc Med* 9(3-4): 70-7.
54. HAMADA, J., NAGAYASU, H., KAWANO, T., MIZUTANI, T., NAKATA, D., HOSOKAWA, M. & TAKEICHI, N. (1998). Characterization of the progressive sublines derived from a weakly malignant cloned cell line, ER-1, co-inoculated subcutaneously with a foreign body. *Clin. Exp. Metastasis*. 16: 291-8.
55. HAVSTEEN, B. H. (2002). "The biochemistry and medical significance of the flavonoids." *Pharmacol Ther* 96(2-3): 67-202.
56. HEATWOLE, V. M. (1999). TUNEL assay for apoptotic cells. *Methods in Molecular Biology*, 115(3), 141–148.
57. HIDALGO M, PIERSON AS, HOLDEN SN, BERGEN M, ECKHARDT SG (2001) Therapeutic angiogenesis inhibitors in the treatment of cancer. *Adv Intern Med* 47:159-90.
58. HILDEBRAND, J.; DEWITTE, O.; DIETRICH, P.Y.; TRIBOLET, N. (1997). Management of malignant brain tumours. *Eur. Neurol* 38(3):238-253.
59. HOA, N., L. GE, et al. "Glioma Cells Display Complex Cell Surface Topographies That Resist the Actions of Cytolytic Effector Lymphocytes." *The Journal of Immunology* 185(8): 4793-4803.
60. HODEK, P., HANUSTIAK, P., KRÍZKOVÁ, J., MIKELOVA, R., KRÍZKOVÁ, S., STIBOROVÁ, M., TRNKOVÁ, L., HORNA, A., BEKLOVÁ, M., KIZEK, R. (2006). Toxicological aspects of flavonoid interaction with biomacromolecules. *Neuroendocrinology Letters*, 27(2), 14-17.
61. HOSSAIN, M. Z., L. R. WILKENS, et al. (1989). "Enhancement of gap junctional communication by retinoids correlates with their ability to inhibit neoplastic transformation." *Carcinogenesis* 10(9): 1743-8.

62. HSU M, ANDL T, LI G, MEINKOTH JL, HERLYN M. (2000) Cadherin repertoire determines partner-specific gap junctional communication during melanoma progression. *J Cell Sci.*;113 ( Pt 9):1535–1542.
63. HUETTNER C, CZUB S, KERKAU S, ROGGENDORF W, TONN J-C (1997) Interleukin 10 is expressed in human gliomas in vivo and increases glioma cell proliferation and motility in vitro. *Anticancer research* 17(5A):3217-3224.
64. ITO, S., T. FUKUSATO, et al. (2002). "Coexpression of glucose transporter 1 and matrix metalloproteinase-2 in human cancers." *J Natl Cancer Inst* 94(14): 1080-91.
65. JEONG, J. I., CHEON, KIM, M. S., KIM, T. H., & KIM, Y. K. (2009). Kaempferol Induces Cell Death Through ERK and Akt-Dependent Down-Regulation of XIAP and Survivin in Human Glioma Cells. *Neurochemical Research*, 34(5), 991-1001.
66. KACZMAREK, E., S. ZAPF, et al. (1999). "Dissecting glioma invasion: interrelation of adhesion, migration and intercellular contacts determine the invasive phenotype." *International Journal of Developmental Neuroscience* 17(5-6): 625-641.
67. KALLMANN, B. A., S. WAGNER, et al. (2002). "Characteristic gene expression profile of primary human cerebral endothelial cells." *FASEB J* 16(6): 589-91.
68. KANDEL ER. Nerve cells and behavior. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, editors. *Principles of neural science*. 4<sup>th</sup> ed. New York; 2000.
69. KANDEL, E. R. and L. R. SQUIRE (2000). "Neuroscience: breaking down scientific barriers to the study of brain and mind." *Science* 290(5494): 1113-20.
70. KIM, E., C. CHOI, et al. (2008). "Underlying Mechanism of Quercetin-induced Cell Death in Human Glioma Cells." *Neurochemical Research* 33(6): 971-979.
71. KIM, H., Y. S. KIM, et al. (2001). "The plant flavonoid wogonin suppresses death of activated C6 rat glial cells by inhibiting nitric oxide production." *Neurosci Lett* 309(1): 67-71.
72. KIM, S., J. H. CHOI, et al. (2009). "Silibinin prevents TPA-induced MMP-9 expression and VEGF secretion by inactivation of the Raf/MEK/ERK pathway in MCF-7 human breast cancer cells." *Phytomedicine* 16(6-7): 573-80.
73. KING T. J., BERTRAM J. S. (2005) Connexins as targets for cancer chemoprevention and chemotherapy. *Bioch et Bioph Acta* 1719 146 – 160.
74. KING, T. J. and P. D. LAMPE (2005). "Altered tumor biology and tumorigenesis in irradiated and chemical carcinogen-treated single and combined connexin32/p27Kip1-deficient mice." *Cell Commun Adhes* 12(5-6): 293-305.

75. KING, T. J. and P. D. LAMPE (2005). "Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues." *Biochim Biophys Acta* 1719(1-2): 24-35.
76. KING, T. J., K. E. GURLEY, et al. (2005). "Deficiency in the gap junction protein connexin32 alters p27Kip1 tumor suppression and MAPK activation in a tissue-specific manner." *Oncogene* 24(10): 1718-26.
77. KITADAI, Y., K. HARUMA, et al. (2000). "Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8." *Clin Cancer Res* 6(7): 2735-40.
78. KLEIHUES P., BURGER, PC, SCHNEIDER BW (1993) The new WHO classification of brain-tumors. *Brain Pathology* 3(3):255-268.
79. KOKILEVA, L. (1994). Multi-step chromatin degradation in apoptosis. DNA breakdown in apoptosis. *International archives of allergy and immunology*, 105(4), 339–343.
80. KONDRAGANTI, S., S. MOHANAM, et al. (2000). "Selective suppression of matrix metalloproteinase-9 in human glioblastoma cells by antisense gene transfer impairs glioblastoma cell invasion." *Cancer Res* 60(24): 6851-5.
81. KOSMEHL, H., A. BERNDT, et al. (1995). "Differential expression of fibronectin splice variants, oncofetal glycosylated fibronectin and laminin isoforms in nodular palmar fibromatosis." *Pathol Res Pract* 191(11): 1105-13.
82. KOUL, D., R. PARTHASARATHY, et al. (2001). "Suppression of matrix metalloproteinase-2 gene expression and invasion in human glioma cells by MMAC/PTEN." *Oncogene* 20(46): 6669-78.
83. KOULAKOFF, A., W. MEME, et al. (2003). "Neurons and brain macrophages regulate connexin expression in cultured astrocytes." *Cell Commun Adhes* 10(4-6): 407-11.
84. KRZEMINSKI, P. (2005). Modulation of ERK1/2 activity in crucial for sphingosine-induced death of glioma C6 cells. *Acta Biochim Pol.* 52, 927–930.
85. LAL, P. G., R. S. GHIRNIKAR, et al. (1996). "Astrocyte-astrocytoma cell line interactions in culture." *J Neurosci Res* 44(3): 216-22.
86. LAMARTINIERE, C. A., COTRONEO, M. S., FRITZ, W. A., WANG, J., MENTOR-MARCEL, R., ELGAVISH, A. (2002). Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate. *Journal of Nutrition.* 132(3), 552-558.
87. LAMPERT, K., U. MACHEIN, et al. (1998). "Expression of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in human brain tumors." *Am J Pathol* 153(2): 429-37.



88. LEFRANCOIS, T., C. FAGES, et al. (1997). "Neuritic outgrowth associated with astroglial phenotypic changes induced by antisense glial fibrillary acidic protein (GFAP) mRNA in injured neuron-astrocyte cocultures." *J Neurosci* 17(11): 4121-8.
89. LENT, R. (2005). *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências*. Ed. Atheneu. São Paulo. Pag 89-94.
90. LI, A., S. DUBEY, et al. (2003). "IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis." *J Immunol* 170(6): 3369-76.
91. LI, G. & HERLYN, M. (2000). Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol. Med. Today*. 6: 163-169;
92. LIN, C.-W., W.-C. HOU, et al. (2008). "Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC $\beta$ /ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells." *Carcinogenesis* 29(9): 1807-1815.
93. LIPKIN, M. (1999). Dietary factors in human colorectal cancer. *Annual Review of Nutrition*, 19(1), 545-586.
94. LOUIS, D.N, OHGAKI, H., WIESTLER, O.D., CAVENEE, W.K., BURGER, P.C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B.W., KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.*, 114(2):97-109.
95. LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
96. LUCA, M., S. HUANG, et al. (1997). "Expression of interleukin-8 by human melanoma cells up-regulates MMP-2 activity and increases tumor growth and metastasis." *Am J Pathol* 151(4): 1105-13.
97. MA, W., T. TAVAKOLI, et al. (2008). "Cell-extracellular matrix interactions regulate neural differentiation of human embryonic stem cells." *BMC Dev Biol* 8: 90.
98. MARTINS RDE, P., C. BRAGA HDE, et al. (2009). "Synergistic neurotoxicity induced by methylmercury and quercetin in mice." *Food Chem Toxicol* 47(3): 645-9.
99. MC GRAW, J., G. W. HIEBERT, ET AL. (2001). "Modulating astrogliosis after neurotrauma." *J Neurosci Res* 63(2): 109-15.
100. MCCOMBE, P. A., J. DE JERSEY, et al. (1994). "Inflammatory cells, microglia and MHC class II antigen-positive cells in the spinal cord of Lewis rats with acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol* 51(2): 153-67.

101. MCDONOUGH, W. S., JOHANSSON, A., JOFFEE, H., GIESE, A. & BERENS, M. E. (1999). Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *Int. J. Dev. Neurosci.* 17: 601-11.
102. MCGRAW, J., G. W. HIEBERT, et al. (2001). "Modulating astrogliosis after neurotrauma." *J Neurosci Res* 63(2): 109-15.
103. MEAD C, PENTREATH VW. (1998) Evaluation of toxicity indicators in rat primary astrocytes, C6 glioma and human 1321N1 astrocytoma cells: can gliotoxicity be distinguished from cytotoxicity? *Arch Toxicol.* May;72(6):372-80.
104. MERCER LD, KELLY BL, HORNE MK, BEART PM (2005) Dietary polyphenols protect dopamine neurons from oxidative insults and apoptosis: investigations in primary rat mesencephalic cultures. *Biochem Pharmacol.* 69(2):339-45.
105. MIDDLETON, E., C. KANDASWAMI, et al. (2000). "The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells: Implications for Inflammation, Heart Disease, and Cancer." *Pharmacological Reviews* 52(4): 673-751.
106. MODICA-NAPOLITANO, J. S. and K. SINGH (2002). "Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer." *Expert Reviews in Molecular Medicine* 4(09): 1-19.
107. MOKUNO, K., J. KAMHOLZ, et al. (1989). "Neuronal modulation of Schwann cell glial fibrillary acidic protein (GFAP)." *J Neurosci Res* 23(4): 396-405.
108. MONTGOMERY, D. L. (1994). "Astrocytes: form, functions, and roles in disease." *Vet Pathol* 31(2): 145-67.
109. MORLEY, N., RAPP, A., DITTMAR, H., SALTER, L., GOULD, D., GREULICH, K. O., CURNOW, A. (2006). UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis Advance Access*, 24(2), 105-114.
110. NADARAJAH B. (2003) Radial glia and somal translocation of radial neurons in the developing cerebral cortex. *Glia*; 43:33-6.
111. NAIR, H. K., K. V. K. RAO, et al. (2004). "Inhibition of Prostate Cancer Cell Colony Formation by the Flavonoid Quercetin Correlates with Modulation of Specific Regulatory Genes." *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11(1): 63-69.
112. NAKADA, M., H. NAKAMURA, et al. (1999). "Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors." *Am J Pathol* 154(2): 417-28.

113. NAKADA, M.; NAKADA, S.; DEMUTH, T.; TRAN, N. L.; HOELZINGER, D. B.; BERENS, M. E. (2007). Molecular targets of glioma invasion Review. *Cell. Mol. Life Sci.* (64): 458 – 478.
114. NAUS, C. C. G. & BANI-YAGHOUB, M. (1998). Gap junctional communication in the developing central nervous system. *Cell Biol. Int.* 22: 751-763;
115. NAUS, C. C. G., ELISEVICH, K., ZHU, D., BELLIVEAU, D. J. & DEL MAESTRO, R. F. (1992). In vivo growth of C6 glioma cells transfected with Cx43 cDNA. *Cancer Res.* 52: 4208-4213;
116. NAVOLOTSKI, A., RUMJNZEV, A., LU, H., PROFT, D., BARTHOLMES, P. & ZANKER, K. S. (1997). Migration and gap junctional intercellular communication determine the metastatic phenotype of human tumor cell lines. *Cancer Lett.* 118:181-187;
117. NGAMENI, B., M. TOUAIBIA, et al. (2006). "Inhibition of MMP-2 secretion from brain tumor cells suggests chemopreventive properties of a furanocoumarin glycoside and of chalcones isolated from the twigs of *Dorstenia turbinata*." *Phytochemistry* 67(23): 2573-9.
118. NORTON WT, AQUINO DA, HOZUMI I, CHIU FC, BROSANAN CF (1992) Quantitative aspects of reactive gliosis. A review. *Neurochemical Research* 17:877-85.
119. O'CALLAGHAN JP. (1991) Assessment of neurotoxicity: Use of glial fibrillary acidic protein as a biomarker. *Biomed. Environ. Sci.*; 4:197–206.
120. OLIVEIRA R, CHRISTOV C, GUILLAMO JS, DE BOUARD S, PALFI S, VENANCE L, TARDY M, PESCHANSKI M (2005) Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol.* 6(1):7.
121. PAILLAUD, E.; COSTA, S.; FAGES, C.; PLASSAT, J.L.; ROCHETTE-EGLY, Y. C.; PERZELOVA, A.; TARDY, M. (2001a) Effects of a novel synthetic retinoid on malignant glioma in vitro: Inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and differentiation. *Eu. J Cancer* (37):520-530.
122. PARK, M. J., M. S. KIM, et al. (2002). "PTEN Suppresses Hyaluronic Acid-induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in U87MG Glioblastoma Cells through Focal Adhesion Kinase Dephosphorylation." *Cancer Res* 62(21): 6318-6322.
123. PARNAVELAS, J. G. and B. NADARAJAH (2001). "Radial glial cells. are they really glia?" *Neuron* 31(6): 881-4.
124. PENTREATH, V. W., M. R. COOKSON, et al. (1994). "Trypanosoma brucei products activate components of the reactive response in astrocytes in vitro." *Bull Soc Pathol Exot* 87(5): 323-9.

125. PERZELCOVA, A., MACIKOVA, et al. (2000). "Co-expression of GFAP, vimentin and cytokeratins in GL-15 glioblastoma cell line." *Neoplasma* 47(6): 362-6.
126. PLANCHENAU T, COSTA S, FAGES C, RICHE D, CHARRIERE-BERTRAND C, PERZELOVA A, BARLOWATZ-MEIMON G, TARDY M (2001) Differential expression of laminin and fibronectin and of their related metalloproteinases in human glioma cell lines: relation to invasion. *Neurosci Lett* 299(1-2):140-4.
127. PU, F., K. MISHIMA, et al. (2007). "Neuroprotective effects of quercetin and rutin on spatial memory impairment in an 8-arm radial maze task and neuronal death induced by repeated cerebral ischemia in rats." *J Pharmacol Sci* 104(4): 329-34.
128. QIN, H., Y. SUN, et al. (1999). "The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells." *J Biol Chem* 274(41): 29130-7.
129. RAGHUPATHI, R. (2004). "Cell death mechanisms following traumatic brain injury." *Brain Pathol* 14(2): 215-22.
130. RAMOS, S. (2007) Effects of dietary flavonoids on apoptotic pathways related to cancer chemoprevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 18(7), 427-442.
131. RATABOUL P, VERNIER P, BIGUET NF, MALLET J, POULAT P, PRIVAT A (1989) Modulation of GFAP mRNA levels following toxic lesions in the basal ganglia of the rat. *Brain Res Bull* 22(1):155-61.
132. RIBEIRO, D. A. (2006). Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. *Brazilian Dental Journal*, 17(2), 91-94.
133. ROBBERS, J. E., TYLER, V. E., SPEEDIE, M. K. (1997). *Farmacognósia e Farmacobiotechnologia*. Brasil. Editora: Editorial Premier. 157-158.
134. ROSELL, A., J. ALVAREZ-SABIN, et al. (2005). "A matrix metalloproteinase protein array reveals a strong relation between MMP-9 and MMP-13 with diffusion-weighted image lesion increase in human stroke." *Stroke* 36(7): 1415-20.
135. ROSENBERG, G. A. (2009). "Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases." *Lancet Neurol* 8(2): 205-16.
136. ROTH, W., C. WILD-BODE, et al. (2000). "Secreted Frizzled-related proteins inhibit motility and promote growth of human malignant glioma cells." *Oncogene* 19(37): 4210-20.

137. ROUACH, N., A. KOULAKOFF, et al. (2004). "Neurons set the tone of gap junctional communication in astrocytic networks." *Neurochem Int* 45(2-3): 265-72.
138. RUTKA, J. T., HUBBARD, S. L., FUKUYAMA, K., MATSUZAWA, K., DIRKS, P. B., BECKER, L. E. (1994). Effects of antisense glial fibrillary acidic protein complementary DNA on growth, invasion, and adhesion of human astrocytoma cells. *Cancer Research*, 54(12), 3267-3272.
139. RUTKA, J. T., J. R. GIBLIN, et al. (1986). "Establishment and Characterization of a Cell Line from a Human Gliosarcoma." *Cancer Research* 46(11): 5893-5902.
140. RUTKA, J. T., M. MURAKAMI, et al. (1997). "Role of glial filaments in cells and tumors of glial origin: a review." *J Neurosurg* 87(3): 420-30.
141. RUTKA, J.T. & SMITH, S.L. (1993) Transfection of human astrocytoma cells with glial fibrillary acid protein complementary DNA: analysis of expression, proliferation, and tumorigenicity. *Cancer Res* (55): 3624-3631.
142. SAGARA, Y., VANHNASY, J., MAHER, P. (2004). Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. *Journal of neurochemistry*, 90(5), 1144-1155.
143. SALLINEN, S. L., P. K. SALLINEN, et al. (2000). "Identification of differentially expressed genes in human gliomas by DNA microarray and tissue chip techniques." *Cancer Res* 60(23): 6617-22.
144. SANCHO-TELLO, M. (1995). Developmental pattern of GFAP and vimentin gene expression in rat brain and in radial glial cultures. *Glia*, 15(2), 157– 166.
145. SANFELIU, C., J. M. WRIGHT, et al. (1999). "Neurotoxicity of isoniazid and its metabolites in cultures of mouse dorsal root ganglion neurons and hybrid neuronal cell line." *Neurotoxicology* 20(6): 935-44.
146. SANTOS, B. L., A. R. SILVA, et al. "Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells." *Food Chemistry* 127(2): 404-411.
147. SCHARTNER JM, HAGAR AR, VAN HANDEL M, ZHANG L, NADKARNI N, BADIE B. (2005) Impaired capacity for upregulation of MHC class II in tumour-associated microglia. *Glia* ; 51: 279–85.
148. SENGER D, CAIRNCROSS JG, AND FORSYTH PA (2003). Long-term survivors of glioblastoma: statistical aberration or important unrecognized molecular subtype? *Cancer J* 9 (3), 214–221.

149. SHEN, K.-H., S.-H. HUNG, et al. "Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway." *Molecular and Cellular Biochemistry* 333(1): 279-291.
150. SILVA AR, HUGHES JB, BARRETO RA, SOUZA JS, COSTA MFD, EL-BACHÁ RS, VELOZO ES, TARDY M, FREIRE SM, COSTA SL (2002) The flavonoid rutin, extracted from *dimorphandra mollis*, inhibits proliferation and stimulates differentiation of GL-15 human glioblastoma cells.. In: XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, , Cuiabá. Anais do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2002 [Resumo].
151. SILVA AR, HUGHES JB, BARRETO RA, SOUZA JS, COSTA MFD, EL-BACHÁ RS, VELOZO ES, TARDY M, FREIRE SM, COSTA SL (2002) The flavonoid rutin, extracted from *dimorphandra mollis*, inhibits proliferation and stimulates differentiation of GL-15 human glioblastoma cells.. In: XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, , Cuiabá. Anais do XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2002 [Resumo].
152. SILVA AR, PINHEIRO AM, FREITAS SRVB, SANTOS CVCD, VELOZO ES, COSTA MFD, FREIRE SM, TARDY M, EL-BACHA RS, COSTA SL (2005) Effects of the flavonoid rutin on the expression of GFAP, TNF-alfa and IL-10 in rat cortical astrocytes.. In: XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005, Aguas de Lindóia.
153. SILVA, A. R., PINHEIRO, A. M., SOUZA, C. S., FREITAS, S. R. V. B., VASCONCELLOS, V., FREIRE, S. M., VELOZO, E. S., TARDY, M., EL-BACHÁ, R. S., COSTA, M. F. D., COSTA, S. L. (2008). The flavonoid rutin induces astrocyte and microglia activation and regulates TNF-alpha and NO release in primary glial cell cultures. *Cell Biology and Toxicology*, 24(1), 75-89.
154. SLIWA, M., D. MARKOVIC, et al. (2007). "The invasion promoting effect of microglia on glioblastoma cells is inhibited by cyclosporin A." *Brain* 130(2): 476-489.
155. SMIRNIOTOPOULOS, J. G., F. M. MURPHY, et al. (2007). "Patterns of Contrast Enhancement in the Brain and Meninges1." *Radiographics* 27(2): 525-551.
156. SMIRNIOTOPOULOS, J. G.; MURPHY, F. M.; RUSHING, E. J.; REES, J. H.; SCHROEDER, J. W. (2007). From the Archives of the AFIP: Patterns of Contrast Enhancement in the Brain and Meninges. *Radiographics* 27 (2): 525-51.
157. SOFFIETTI R, LEONCINI B, AND RUDA R (2007). New developments in the treatment of malignant gliomas. *Expert Rev Neurother* 7 (10), 1313-1326.
158. SOROCEANU, L., T. J. MANNING, et al. (1999). "Modulation of Glioma Cell Migration and Invasion Using Cl<sup>-</sup> and K<sup>+</sup> Ion Channel Blockers." *The Journal of Neuroscience* 19(14): 5942-5954.

159. SOUZA, CLEIDE DOS SANTOS (2009). Efeitos do flavonóide agathisflavona obtido a partir de folhas da *Caesalpinia pyramidalis* na morfogênese de células de glioblastoma, neuroblastoma, co-cultura neurônio/glia e células tronco-embrionárias murinas. Dissertação de mestrado.
160. SPOHR, TCL, STIPURSKY, J, SASAKI, AC, BARBOSA, PEDRO ROCHA ; MARTINS, V, BENJAMIM, CF, ROQUE, NF, COSTA, SL, GOMES, FCA. (2010). Effects of the flavonoid casticin from Brazilian in cerebral cortical progenitors in vitro: direct and indirect action through astrocytes. *Journal of Neuroscience Research*, v. 88, p. 530-541.
161. STREIT WJ, WALTER SA, PENNEL NA (1999) Reactive microgliosis. *Progress in Neurobiology* 57: 563 -581.
162. STUPP R, HEGI ME, GILBERT MR, AND CHAKRAVARTI A (2007). Chemoradiotherapy in malignant glioma: standard of care and future directions. *J Clin Oncol* 25 (26), 4127–4136.
163. TANWAR, M. K., M. R. GILBERT, et al. (2002). "Gene expression microarray analysis reveals YKL-40 to be a potential serum marker for malignant character in human glioma." *Cancer Res* 62(15): 4364-8.
164. TARDY M (1991) Astrocyte et Homeostasie. *Médecine Science* 8 (7):799-804.
165. TARDY, M., G. LE PRINCE, et al. (1991). "Neuron-glia interaction. Effect of serotonin and DBcAMP on the expression of GFAP and its encoding message." *Ann N Y Acad Sci* 633: 630-2.
166. TARDY, M., M. F. COSTA, et al. (1982). "Uptake and binding of serotonin by primary cultures of mouse astrocytes." *Dev Neurosci* 5(1): 19-26.
167. TICE, R. R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B., HARTMANN, A., KOBAYASHI, H., MIYAMAE, Y., ROJAS, E., RYU, J. C., SASAKI, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35(3), 206-221.
168. VANDIER D, RIXE O, BRENNER M, GOYETTE A, BESNARD F (1998) Selective killing of glioma cell lines using an astrocyte-specific expression of herpes simplex virus-thymidine kinase gene. *Cancer Res* 58:4577-4580.
169. VAUX, D. L., STRASSER, A. (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(6), 2239–2244.
170. VINCENT, L., W. CHEN, et al. (2001). "Inhibition of endothelial cell migration by cerivastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor: contribution to its anti-angiogenic effect." *FEBS Lett* 495(3): 159-66.

171. VIOLA H, WOLFMAN C, MARDER M, GOUTMAN JD, BIANCHIN M, WASOWSKI C, CALVO DJ, IZQUIERDO I, PALADINI AC, MEDINA JH. (2000) 6-Chloro-3'-nitroflavone is a potent ligand for the benzodiazepine binding site of the GABA(A) receptor devoid of intrinsic activity. *Pharmacol Biochem Behav.* 65(2):313-20.
172. WANG, L., Y. LING, et al. "Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells." *Cancer Letters* 297(1): 42-48.
173. WESTPHAL, M., H. NAUSCH, ET AL. (1990). "Antigenic staining patterns of human glioma cultures: primary cultures, long-term cultures and cell lines." *J Neurocytol* 19(4): 466-77.
174. YANAMANDRA, N., K. V. GUMIDYALA, et al. (2004). "Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis." *Oncogene* 23(12): 2224-30.
175. YANG, K., LAMPRECHT, S. A., LIU, Y., SHINOZAKI, H., FAN, K., LEUNG, D., NEWMARK, H., STEELE, V. E., KELLOFF, G. J., LIPKIN, M. (2000). Chemoprevention studies of the flavonoids quercetin and rutin in normal and azoxymethane-treated mouse colon. *Carcinogenesis*, 21(9), 1655-1660.
176. YOON, S. O., S. J. PARK, et al. (2002). "Sustained production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF-kappa B pathway." *J Biol Chem* 277(33): 30271-82.
177. YOSHIDA, D., K. WATANABE, et al. (2003). "Apoptotic induction by BE16627B on human malignant glioma cell lines by an anti-matrix metalloproteinase agent." *Brain Tumor Pathology* 20(1): 13-19.
178. YOUDIM, K.A., QAISER, M.Z., BEGLEY, D.J. (2004) Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 592–604.
179. ZHANG L.X., COONEY, R.V. BERTRAM J.S., (1991) Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action, *Carcinogenesis* 12 2109– 2114.
180. ZHANG W, COULDWELL WT, SIMARD MF, SONG H, LIN JH, NEDERGAARD M (1999). Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer Res*, 59(8):1994-2003
181. ZHANG, L. X., R. V. COONEY, et al. (1991). "Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action." *Carcinogenesis* 12(11): 2109-14.



**ANEXOS**